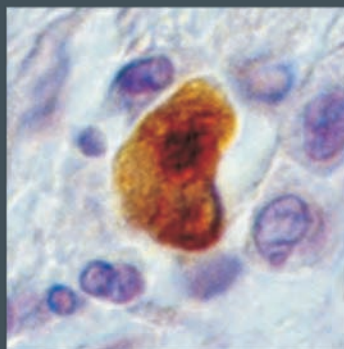




UNTERSUCHUNGEN ZUM IMMUNHISTOLOGISCHEN NACHWEIS VERSCHIEDENER STRUKTURPROTEINE DES FELINEN INFEKTIÖSEN PERITONITIS (FIP)-VIRUS

BIANCA WEBER



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität

Betreuer: Prof. Dr. Manfred Reinacher

**Untersuchungen zum immunhistologischen Nachweis
verschiedener Strukturproteine des Feline Infektiösen
Peritonitis (FIP)-Virus**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des
Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

BIANCA WEBER

Tierärztin aus Schongau

Gießen, 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Reinacher

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-J. Thiel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.01.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Ätiologie und Historie der Feline Infektiösen Peritonitis (FIP).....	2
2.2	Coronaviren	3
2.2.1	Morphologie und Virionenstruktur	3
2.2.2	Replikation und Translation	5
2.2.3	Klassifikation	9
2.3	Coronaviren der Katze	11
2.4	FIP	12
2.4.1	Epizootologie der FIP	12
2.4.2	Klinische Symptomatik, pathologisch-anatomische und histologische Befunde der FIP	16
2.4.3	Pathogenese der FIP	19
2.5	Postmortale Diagnose der FIP.....	21
2.5.1	Vorbehandlungen der zur Immunhistologie verwendeten Schnitte.....	22
2.5.2	Unspezifische Hintergrundfärbung	24
3	Material und Methoden	26
3.1	Untersuchungsmaterial.....	26
3.1.1	Erhaltungszustand der Sektionskatzen	27
3.2	Bearbeitung der Proben für die histologische und immunhistologische Untersuchung	27
3.2.1	Fixierung und histopathologische Präparation	27
3.3	Immunhistologie.....	28
3.3.1	Seren	28
3.3.1.1	Kaninchen-, Pferde-, Ratten- und Schweineserum	28
3.3.2	Antiseren.....	28
3.3.2.1	Primärantikörper	28
3.3.2.2	Sekundärantikörper	30
3.3.2.3	Tertiärantikörper und Detektionssysteme.....	30
3.3.3	Immunhistologischer Nachweis der FCoV-Antigene	31
3.3.3.1	Vorbehandlungen	35
3.3.3.1.1	DAKO® Target Retrieval Solution (DTRS).....	35
3.3.3.1.2	Linaris® Histosafe Enhancer (LHE)	35
3.3.3.1.3	Target Unmasking Fluid® (TUF-) Behandlung.....	35
3.3.3.1.4	Trypsin-Behandlung	36
3.3.3.1.5	Zitrapuffer-Behandlung.....	36
3.3.3.1.6	Kombination der Zitratpuffer-Behandlung mit der DAKO® Target Retrieval Solution-Behandlung als Vorbehandlung für die Inkubation mit dem Antikörpercocktail	36
3.3.3.2	Detektionssysteme	38
3.3.3.2.1	Peroxidase-anti-Peroxidase Methode (PAP-Methode)	38
3.3.3.2.2	Labeled Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode)	38
3.3.4	Immunhistologischer Nachweis von myeloid/histiocyte-Antigen	38
3.3.5	Immunhistologischer Nachweis von Immunglobulin G.....	40
3.4	Versuchsaufbau	41
3.4.1	Antikörperversuchsreihe.....	41
3.4.2	Semiquantitative Bewertung und Beurteilung des Einflusses postmortaler Faktoren auf die Signalstärke	42
3.4.3	Immunhistologischer Nachweis der FCoV-Antigene bei fraglichen FIP-Fällen.....	43
3.4.4	Immunhistologische Kontrollen.....	43
3.5	Kriterien zur Beurteilung der immunhistologischen Reaktion.....	44

3.5.1	Nachweis von FCoV-Antigen.....	44
3.5.2	Kriterien für die Beurteilung der Antikörperversuchsreihe und der semiquantitativen Bewertung.....	44
3.6	Statistische Analyse.....	45
4	Ergebnisse	47
4.1	Ergebnisse der Antikörperversuchsreihe.....	48
4.1.1	Verdünnung, Vorbehandlung und Nachweismethode bei der Verwendung der einzelnen monoklonalen Antikörper	48
4.1.1.1	Ergebnisse bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers FCV3-70	49
4.1.1.2	Ergebnisse bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers 52D5	50
4.1.1.3	Ergebnisse bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers F19-1	51
4.1.1.4	Ergebnisse bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers 6F7	52
4.1.1.5	Ergebnisse bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers 1F12	53
4.1.1.6	Ergebnisse bei der Verwendung der Kombination ausgewählter monoklonaler Antikörper (52D5, FCV3-70, F19-1 und 1F12) als „Cocktail“	54
4.2	Auswertung des Nachweises der verschiedenen Strukturproteine des Felinen Coronavirus (FCoV)	55
4.2.1	Immunhistologischer Nachweis des N-Proteins mit den monoklonalen Antikörpern FCV3-70 und 52D5.....	55
4.2.2	Immunhistologischer Nachweis des M-Proteins mit den monoklonalen Antikörpern F19-1 und 6F7.....	56
4.2.2.1	Markierung von Plasmazellen durch den monoklonalen Antikörper 6F7	57
4.2.3	Immunhistologischer Nachweis des S-Proteins mit dem monoklonalen Antikörper 1F12..	58
4.2.4	Immunhistologischer Nachweis der Proteine N, M und S mit dem „Cocktail“	59
4.3	Ergebnisse der semiquantitativen Bewertung der Reaktionsintensität und der Beurteilung des Einflusses postmortaler Faktoren auf die Signalstärke	60
4.3.1	Kontrollen.....	61
4.3.1.1	Positivkontrolle.....	61
4.3.1.2	Negativkontrolle	61
4.3.2	Untersuchung der Korrelation der Variablen Frischegrad, Reaktionsintensität und Hintergrundfärbung.....	61
4.3.2.1	Einfluss des Frischegrades	61
4.3.2.2	Hintergrundfärbung.....	62
4.3.3	Vergleich der untersuchten Granulome hinsichtlich der Reaktionsintensität mit den einzeln verwendeten monoklonalen Antikörpern und dem „Cocktail“	62
4.3.3.1	Reaktionsintensität	62
4.3.4	Vergleich der Markierungen von Virus-Strukturproteinen mit unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern	63
4.4	Immunhistologischer Nachweis der FCoV-Antigene bei fraglichen FIP-Fällen	66
5	Diskussion.....	68
5.1	Untersuchungsmaterial.....	68
5.2	Bemerkungen zum Aufbau und zur Auswertung der Studie	69
5.2.1	Antikörperversuchsreihe	69
5.2.1.1	Auswahl geeigneter Antikörper und Vorbehandlungen	69
5.2.1.2	Material und Untersuchungsmethoden	71
5.2.1.3	Reaktionsintensität (RI)	73
5.3	Intrazelluläre Verteilung der verschiedenen Strukturproteine	74
5.4	Einflüsse auf das immunhistologische Ergebnis.....	75
5.4.1	Postmortale Veränderungen.....	75
5.4.2	Proteinmenge	76
5.4.3	Empfindlichkeit, Avidität, Variabilität.....	78
5.4.4	Hintergrund	79

5.5	Einsatz der untersuchten monoklonalen Antikörper in der Diagnostik.....	80
6	Zusammenfassung	82
7	Summary	84
8	Literaturverzeichnis	86
9	Abbildungen	104
10	Anhang	116
10.1	Tabellen.....	116
10.2	Lösungen und Puffer	136
10.3	Bezugsquellen	138
10.4	Abkürzungen	141

1 Einleitung

Die Feline Infektiöse Peritonitis (FIP) ist eine systemische Erkrankung junger (meist bis zu 3 Jahre alter) Katzen, die klinisch mit unspezifischen Symptomen wie persistierendem Fieber, Ikterus, Apathie, Gewichtsabnahme und z. T. Ergüssen in den Körperhöhlen einhergeht. Die Erkrankung verläuft in der Regel letal. Der Erreger ist ein felines Coronavirus (FCoV).

Bei der Sektion dieser Tiere stehen granulomatös-nekrotisierende Vaskulitiden, fibrinös-granulomatöse Serositiden und herdförmige granulomatös-nekrotisierende Entzündungen in verschiedenen Organen im Vordergrund.

Der definitive Nachweis der FIP erfolgt mit Hilfe der Immunhistologie.

Antikörper, die gegen Strukturproteine des Virus gerichtet sind, weisen das Virus im FIP-typisch veränderten Gewebe nach.

In manchen Fällen jedoch fällt in der Routinediagnostik das Antikörpersignal relativ schwach oder sogar negativ aus, obwohl die makroskopischen und histologischen Veränderungen des jeweiligen Tieres sehr für eine FIP sprechen.

Daraus ergeben sich für die immunhistologische Diagnostik folgende Fragen:

- 1) Hat der Frischegrad der untersuchten Tiere einen Einfluss auf das Ergebnis der Immunhistologie?
- 2) Kann die immunhistologische Untersuchung eines FIP-erkrankten Tieres zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, wenn unterschiedliche monoklonale Antikörper (mAk) eingesetzt werden, die gegen verschiedene Strukturproteine des FCoV gerichtet sind?
- 3) Unterscheiden sich diese verschiedenen Antikörper aufgrund ihrer unterschiedlichen Zielantigene in der Art der Markierung? Eignen sich dadurch manche dieser Antikörper besser für die Diagnostik als andere?
- 4) Unterscheiden sich diese Antikörper in ihrer intrazellulären Verteilung und können darüber weitere Erkenntnisse über das „virus assembly“ erhalten werden?
- 5) Ist es von Vorteil, die zunächst einzeln verwendeten Antikörper miteinander zu kombinieren („Cocktail“)?

Ziel dieser Arbeit ist es, diese Fragen zu klären und so zu einer Optimierung der FIP-Diagnostik beizutragen.

2 Literaturübersicht

2.1 Ätiologie und Historie der Feline Infektiösen

Peritonitis (FIP)

1966 beschrieben Wolfe und Griesemer zum ersten Mal ein einheitliches neues Krankheitsbild bei Feliden anhand von 16 natürlich erkrankten Katzen:

Alle Tiere zeigten persistierendes Fieber, Aszites mit zunehmender Anorexie, Apathie und Gewichtsverlust. Bei der Sektion aller 16 Katzen fiel eine hochgradige exsudative Peritonitis auf: Die Flüssigkeit war viskös, von gelblich-grauer Farbe, meistens transparent, manchmal von kleinen weißen Flocken durchsetzt. Vergesellschaftet war dieser Befund mit grauem fibrinösem Exsudat auf dem viszeralem und parietalem Peritoneum und mit Granulomen in verschiedenen Organen.

Die Autoren wiesen darauf hin, dass selten vorkommende Peritonitiden bei Katzen von Holzworth bereits 1963 beschrieben wurden. Dieser sah die Peritonitis aber noch als Folgeerkrankung einer durchgebrochenen Pyometra an (Holzworth, 1963). Wolfe und Griesemer vermuteten dagegen Mykoplasmen oder ein Virus als infektiöses Agens. Aufgrund des auffallenden Aszites benannten sie das Krankheitsbild „Feline infektiöse Peritonitis“ (Wolfe und Griesemer, 1966).

Erst 1972 stellten Montali und Strandberg fest, dass neben der klassischen exsudativen Form noch eine trockene Form existierte. Die erkrankten Katzen zeigten zwar keinen Aszites, aber dieselben typischen granulomatösen Entzündungen in verschiedenen Organen, die schon bei der exsudativen Form der FIP beschrieben worden waren (Montali und Strandberg, 1972).

Mittels Elektronenmikroskopie bewies Zook 1968 die Virusätiologie der FIP (Zook, 1968). Doch erst 1976 wurde das Virus aufgrund morphologischer und physikochemischer Eigenschaften von Osterhaus et al. und Pedersen, unabhängig voneinander, als Coronavirus identifiziert (Osterhaus et al., 1976; Pedersen, 1976b).

FIP gilt als eine der häufigsten Katzenkrankheiten in den letzten Jahren. FIP-Fälle machen bis zu 14 % des Katzensektionsgutes eines diagnostischen veterinärpathologischen Instituts aus (Reinacher, 1994).

2.2 Coronaviren

Die Ordnung Nidovirales beinhaltet die Familien *Coronaviridae* und *Arteriviridae*. Die Mitglieder dieser Ordnung zeichnen sich durch ein „nested set“ ihrer multiplen subgenomischen Ribonukleinsäuren (RNS) aus (Lai und Holmes, 2001).

Die Gattung der Coronaviren gehört mit den Toroviren zur Familie *Coronaviridae*. Die Familie *Coronaviridae* wurde anhand mehrerer Punkte als Gruppe definiert: So waren alle Mitglieder dieser Gruppe kugelförmige bis pleomorphe, große (60-220 nm) behüllte Viren, umgrenzt von typischen keulen- bis blütenblattförmigen Stacheln oder Peplomeren (Wege et al., 1982). Diese Stacheln gaben in Analogie zur Krone (lat. *Corona*) der Familie auch ihren Namen (Holmes, 2001). Mit Hilfe neuer Techniken werden die Viruspartikel heute eher als grobhöckrig und blumenkohlähnlich beschrieben (Masters, 2006).

Das Genom besteht aus einer positiven polyadenylierten Einzelstrang-RNS, welche infektiös ist (Wege et al., 1982; Yount et al., 2000).

Coronaviren haben generell eine hohe Mutationsrate. So liegt der Grad der RNS-Rekombination in Gewebekultur bei experimentellen und natürlichen Infektionen bei etwa 25 % im gesamten Genom, was vermutlich in der diskontinuierlichen Transkription und der hohen Fehlerrate der RNS-Polymerase begründet ist (Holmes, 2001).

2.2.1 Morphologie und Virionenstruktur

Um die Morphologie und Struktur der Coronaviren zu klären, ist es wichtig, eine geeignete Möglichkeit der Kultivierung zu finden.

Aus der Familie der Coronaviren konnten das Murine Hepatitis-Virus (MHV) und das Transmissible Gastroenteritis-Virus (TGEV) bisher am besten charakterisiert werden, da sie in verfügbaren Gewebekulturen wachsen.

Das Feline Coronavirus (FCoV), vor allem der Serotyp I (Kapitel 2.3), ist dagegen äußerst schwer zu kultivieren. Viele Erkenntnisse, die man bei der Erforschung von TGEV und MHV erreicht hat, wurden daher auf das FCoV übertragen (Siddell et al., 1982).

Alle Coronaviren besitzen mindestens vier Strukturproteine: das Nukleokapsidphosphoprotein (N-Protein), das Membranglykoprotein (M-Protein, ehemals E1), das Spieglykoprotein (S-Protein, ehemals E2) und in geringen

Mengen ein weiteres Hüllprotein – das Envelopeprotein (E-Protein) (Siddell et al., 1982; Spaan et al., 1988; Holmes, 2001) (Abbildung 2.1).

Ein kleiner Teil (HEV, HCV-OC43 und BCoV) besitzt zusätzlich ein weiteres Hüllprotein: das Hämagglutinin-Esterase-Glykoprotein (HE).

Mit 27 bis 32 kb weisen Coronaviren die größte genomische Ribonukleinsäure (RNS) aller RNS-Viren auf (Lai und Cavanagh, 1997; Lai und Holmes, 2001). Die virale RNS ist infektiös und kann im tierischen Organismus als mRNS fungieren. Die Reihenfolge der Gene, die für die Replikase (Rep) und die Strukturproteine (siehe oben) kodieren, ist immer: 5'-Repl-S-E-M-N-3'.

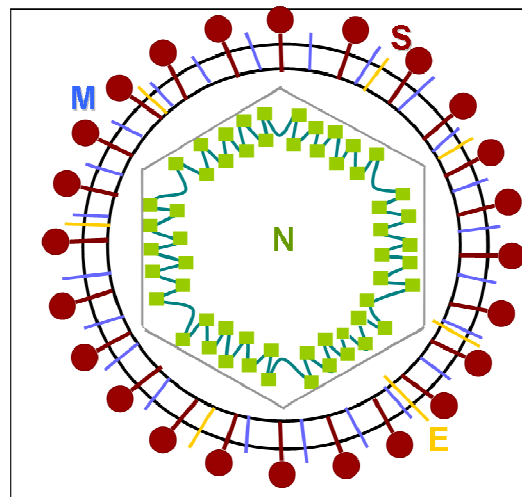


Abbildung 2.1: Aufbau von Coronaviren (modifiziert nach <http://www.virologie.free.fr/34-Coronaviridae/images/rep.>)

E: Envelopeprotein; M: Membranglykoprotein; N: Nukleokapsidprotein
S: Spikeprotein

Das **Nukleokapsidprotein (N-Protein, 50-69kDa)** bildet zusammen mit der einsträngigen Positivstrang-RNS das flexible, helikale Nukleokapsid. Die Positivstrang-RNS besitzt am 3'-Ende eine Polyadenylierung und am 5'-Ende eine Cap-Struktur aus einem 7-Methylguanosin-Rest.

Das N-Protein löst eine zellvermittelte immunologische Reaktion aus (Holmes und Lai, 1996).

Das **Membranprotein (M-Protein, 9-12 kDa)** formt bei nachweislich zwei Coronaviren, dem porcinen transmissiblen Gastroenteritis-Virus (TGEV) und dem murinen Hepatitis-Virus (MHV), eine kugelige, möglicherweise auch ikosaedrische

innere Hülle. Das N-Protein kann daran beteiligt sein (Risco et al., 1996; Lai und Holmes, 2001).

Das M-Protein bestimmt den Ort des „virus-buddings“ und scheint eine Schlüsselrolle im Zusammenbau der Viruspartikel einzunehmen (Vennema et al., 1996; de Haan et al., 2000).

Die Lipoproteinhülle des Virus entsteht durch Budding (Knospung) an spezifischen intrazellulären Membranen, den so genannten „budding compartments“ (Griffiths und Rottier, 1992; Lai und Holmes, 2001). Sie wird von der Innenseite aus durch das M-Protein, dem in größter Menge vorhandenen Hüllprotein, drei Mal umspannt und durchsetzt (Spaan et al., 1988; Locker et al., 1992).

Ein weiteres Hüllprotein, das **Spikeprotein (S-Protein, 180-220 kDa)**, bildet keulenförmige, 12-24 nm lange, kranzartig angeordnete Peplomere, die die Corona des Virus darstellen. Das S-Protein hat mehrere wichtige biologische Funktionen. Zum einen stellt es die Verbindung zu den Rezeptoren der Wirtszelle her, um den Infektionsprozess anzubahnen. Zum anderen veranlasst es die Fusion der viralen Hülle mit der Wirtszellmembran und eine Zell-Zell-Fusion (Siddell et al., 1982; Lai und Holmes, 2001). Außerdem löst es eine zellvermittelte immunologische Reaktion und die Bildung neutralisierender Antikörper aus.

Das von allen Strukturproteinen in geringster Menge im Virus vorhandene **Envelopeprotein (E-Protein)** ist, wie der Name schon sagt, mit der Hülle assoziiert. Es löst gemeinsam mit dem M-Protein den Zusammenbau der Viruspartikel aus (Vennema et al., 1996; Lai und Holmes, 2001; Nal et al., 2005).

2.2.2 Replikation und Translation

Um den Vorgang von Replikation und Translation zu verdeutlichen, wird im Text bei den einzelnen Schritten auf die Abbildung 2.2 verwiesen (siehe Zahlen in Klammern). Bei der zur Replikation der Coronaviren notwendigen Infektion der Wirtszelle bindet das Spikeprotein an spezifische Rezeptoren der Zytoplasmamembran der Wirtszelle. Das Spikeprotein des jeweiligen Coronavirus bestimmt die Wirtsspezies, weil es nur an spezielle Rezeptoren des jeweiligen Wirtes binden kann (Godeke et al., 2000; Kuo et al., 2000).

Beim Felinen Coronavirus und allen anderen der Antigen-Gruppe I zugehörigen Coronaviren (s. u.) ist hierfür die zellmembrangebundene Metalloprotease Aminopeptidase N (APN, CD13) nötig (Lai und Holmes, 2001). APN kommt auf

Epithelzellen des Dünndarms, Granulozyten und myelomonozytären Zellen vor (Delmas et al., 1992; Hegyi und Kolb, 1998).

Nach der Fusion der viralen Hülle mit der zellulären Membran wird das virale Plus-Strang-Genom im Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt **(1)**. Dort findet der gesamte Vermehrungszyklus des FCoV statt.

Nach Freisetzung der viralen RNS ins Zytoplasma der Wirtszelle erfolgt die Translation der Polymerase als Polyprotein, das nach der Spaltung die aktive RNS-Polymerase (auch Replikase genannt) bildet.

Die genauen Mechanismen der Synthese der multiplen subgenomischen RNS sind noch nicht vollständig geklärt. Vorherrschend sind zwei Theorien:

Die erste Theorie wird „leader-primed transcription model“ genannt. Sie geht davon aus, dass die RNS-Replikase eine vollständige Negativstrang-Kopie (Antigenom) von der original genomischen RNS produziert. Die diskontinuierliche Synthese der subgenomischen RNS von dem Antigenom als Matrize bzw. Template, findet während der Positivstrang-RNS-Synthese statt. Die Komplemente der „Transcription regulating sequences“ (TRS) wirken als Promotor für die subgenomische mRNS-Synthese (Lai, 1986).

Die zweite Theorie, „3' discontinuous extension of negative strands model“, besagt, dass die RNS-Replikase nicht nur zur Produktion des Antigenoms verwendet wird, sondern auch zur Bildung eines Sets der subgenomischen Negativstrang-RNS. Dies bedeutet, dass die genomische RNS direkt als Template zur Herstellung der subgenomischen RNS verwendet wird. Dies würde dazu führen, dass die Negativstrang-Synthese diskontinuierlich und die subgenomische mRNS-Synthese kontinuierlich verläuft (Sawicki und Sawicki, 1998). Diese Theorie wird zur Zeit mehr favorisiert als das „leader-primed transcription model“ (in der Abbildung 2.2 in Klammern zu sehen).

Die mRNS in infizierten Zellen besteht aus einem Satz von fünf bis sieben überwiegend polyzistronischen subgenomischen RNS-Positivsträngen. Sie sind am 3'-Ende koterminal und besitzen am 5'-Ende eine „leader sequence“.

Von diesen RNS-Positivsträngen wird nur der am 5'-Ende gelegene ORF translatiert, so dass die mRNS-Stränge funktionell für monozistronisch gehalten werden, obwohl sie von der Struktur her polyzistronisch sind. Die größte Menge an mRNS in der Zelle kodiert für das N-Protein (Lai und Holmes, 2001).

Das **Nukleokapsidprotein (N-Protein)** wird an freien Ribosomen translatiert und im Zytosol phosphoryliert. Bei dem Infektiösen Bronchitis Virus (IBV), dem MHV und dem TGEV kann das Nukleokapsid zusätzlich am Nukleolus der Wirtszelle lokalisiert werden, wobei der Grund dafür noch nicht sicher geklärt ist (Hiscox et al., 2001; Wurm et al., 2001; Chen et al., 2002).

Das phosphorylierte N-Protein verbindet sich mit der neu synthetisierten genomischen RNS zum helikalen Nukleokapsid **(2)**. Der Zusammenbau des Virions erfolgt durch die Bindung des Nukleokapsids an M-Protein-enthaltende intrazelluläre Membranen **(3)**.

Die Translation des **Membranproteins (M-Proteins)** findet an membrangebundenen Polysomen im rauen endoplasmatischen Retikulum (RER) statt **(4)**. Die hier gebildeten Moleküle akkumulieren danach im Golgi-Apparat (Klumperman et al., 1994; Lai und Holmes, 2001).

Bei manchen CoV (IBV, MHV, SARSV) scheint es ein Retentionssignal zu geben, welches das M-Protein im Golgi-Apparat zurückhält (Swift und Machamer, 1991; Locker et al., 1994; Lim und Liu, 2001). Nur in Verbindung mit anderen Strukturproteinen kann es den Golgi-Apparat wieder verlassen. Diese Verbindungen müssen aber kein vollständiges Virion ergeben (z. B. Koppelung zwischen S- und M-Protein oder zwischen HE- und M-Protein) (Nguyen und Hogue, 1997).

Das **Spikeprotein (S-Protein)** wird während seiner Translation in das RER transportiert und gelangt danach als glykosyliertes Homotrimer in den Golgi-Apparat **(5)**.

Die Mehrzahl der S-Proteine akkumuliert im Golgi-Apparat der infizierten Zelle. Dort nehmen sie in Verbindung mit dem M-Protein an der Zusammensetzung der Viruspartikel teil (Opstelten et al., 1995a, 1995b). Einige S-Proteine werden jedoch zur Zytoplasmamembran transportiert, wo sie Zell-Zell-Fusionen vermitteln.

Das **Envelopeprotein (E-Protein)** wird durch das RER zum Golgi-Apparat gebracht, wo es mit dem M-Protein zusammenwirkt, um das „budding“ der Virionen auszulösen **(6)**. Dabei umschließen sie das Nukleokapsid (Fischer et al., 1998).

Hierbei können auch Viruspartikel entstehen, die nicht alle Strukturproteine enthalten. Da das M-Protein jedoch immer dabei ist, scheint es für die Zusammensetzung des Virus eine bedeutende Rolle zu spielen (Vennema et al., 1996; Nguyen und Hogue, 1997).

Danach akkumulieren die Virionen in großen Vesikeln, die ihren Inhalt durch Verschmelzung mit der Plasmamembran freisetzen (7) (Siddell et al., 1982; Lai und Holmes, 2001).

Der Replikationszyklus von FCoV ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

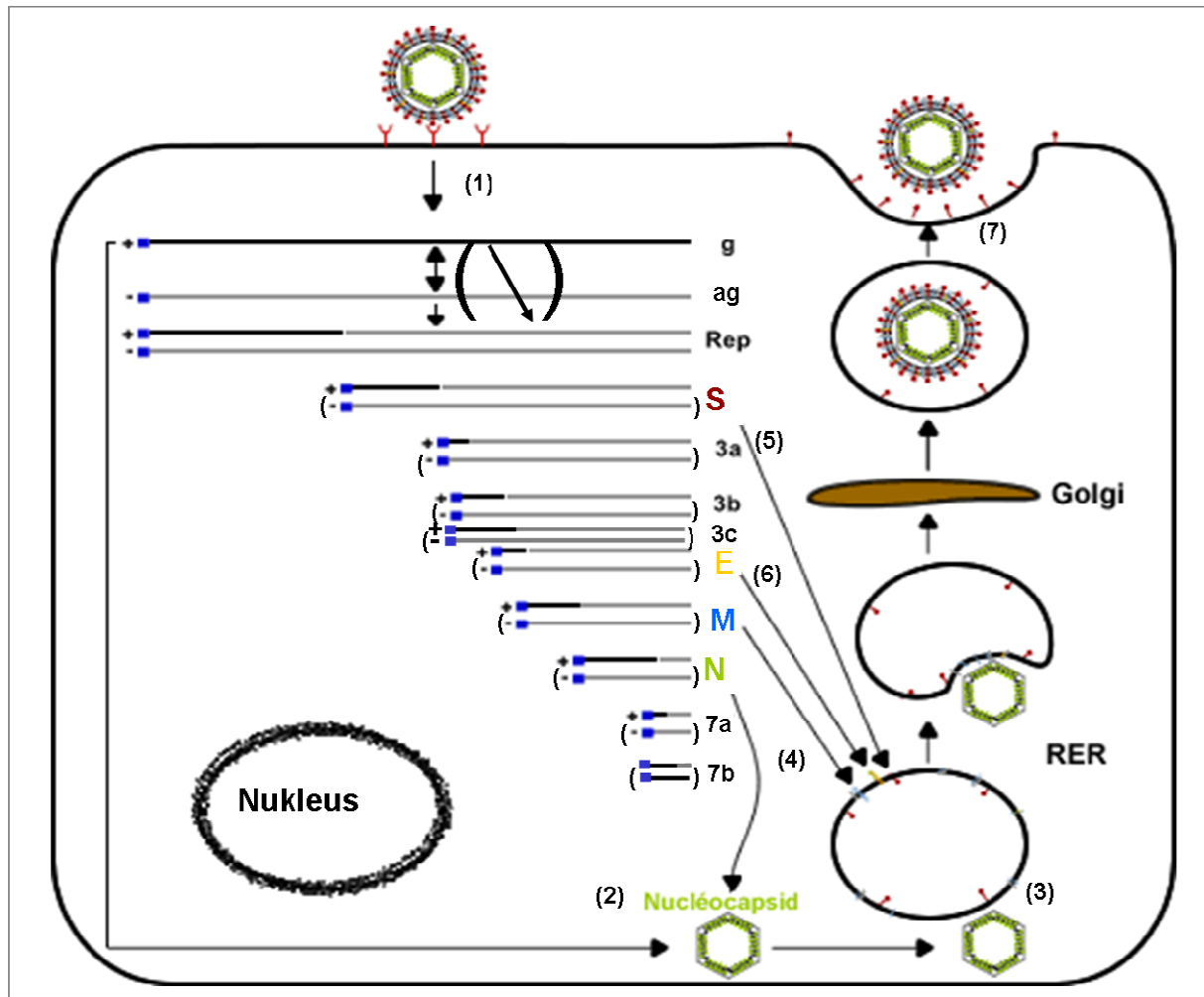


Abbildung 2.2: Replikationszyklus von FCoV (nach Holmes (2001)); modifiziert nach

<http://www.virologie.free.fr/34-Coronaviridae/images/rep>.

ag: Antigenom; E: E-Protein; g: Genom; Golgi: Golgi-Apparat; M: M-Protein, N: N-Protein, Rep: Replikase; RER: raues endoplasmatisches Retikulum; S: S-Protein, 3 abc, 7ab: akzessorische Proteine

2.2.3 Klassifikation

Coronaviren kommen bei Vögeln, vielen Säugetieren und beim Menschen vor. Aufgrund der Spezifität des S-Proteins und seiner Rezeptoren (siehe unter 2.2.2) infizieren sie normalerweise nur eine Tierspezies oder höchstens nahe Verwandte. Damit ist das Wirtsspektrum zwar mit dem spezifischen Rezeptor gekoppelt, der Krankheitstyp dagegen nicht (Kuo et al., 2000).

Das Virus verursacht systemische Infektionen und repliziert dann disseminiert in verschiedenen Zellen oder führt zu lokalen Infektionen und bleibt dann auf wenige Zelltypen beschränkt. und bildet. Bei lokalen Entzündungen sind in erster Linie Epithelzellen des Intestinaltraktes betroffen.

Coronaviren wurden serologisch mittels Antigen-Antikörper-Reaktionen in drei Antigengruppen eingeteilt (Gonzalez et al., 2003). Zwischen diesen Antigengruppen besteht keine Kreuzreaktivität. In jeder Serogruppe konnten die Viren anhand ihrer natürlichen Wirte, Nukleotidsequenzen und ihrer serologischen Verwandtschaft klassifiziert werden.

Jedoch gab es Fälle in Gruppe I, die serologisch nicht kreuzreagierten. Die Ursache hierfür war, dass bei der Einteilung der antigenetischen Verwandtschaft nur eine begrenzte Teilmenge von viralen Proteinen berücksichtigt wurde (Sanchez et al., 1990). Daher wird neuerdings der Sequenzvergleich des gesamten viralen Genoms als Basis für die Gruppenklassifikation verwendet (Gorbalenya et al., 2004).

Fast alle Viren in den Antigen-Gruppen I und II haben Säugetiere als Wirte, wobei menschliche Coronaviren in beiden Gruppen vorkommen. Die Viren der Gruppe III wurden dagegen nur aus Vögeln isoliert.

Die Tabelle 2.1 (modifiziert nach Lai und Holmes (2001)) gibt einen Überblick über die aktuelle Klassifizierung der CoV und die von ihnen verursachten Krankheiten.

Tabelle 2.1: Einteilung der Coronaviren in Serogruppen (modifiziert nach Lai und Holmes (2001))

ANTIGEN-GRUPPE	VIRUS	WIRTSSPEZIES	KRANKHEIT/INFEKTIONSTYP
I	HCoV-229E	Mensch	respiratorische Infektion
	TGEV	Schwein	porzine transmissible Gastroenteritis
	PRCoV	Schwein	respiratorische Infektion
	CCV	Hund	gastrointestinale Infektion
	FECV	Katze	enterale Infektion
	FIPV	Katze	feline infektiöse Peritonitis
	RbCoV	Kaninchen	enterale Infektion
II	HCV-OC43	Mensch	respiratorische Infektion
	SARS	Mensch	respiratorische und enterale Infektion
	MHV	Maus	respiratorische und enterale Infektion
	SDAV	Ratte	Sialodakryadenitis
	HEV	Schwein	Vomitus, Kümern
	BCV	Rind	Enzephalomyelitis
	TCV	Truthahn	respiratorische und enterale Infektion
III	IBV	Huhn	infektiöse Tracheobronchitis

BCV: bovines Coronavirus; **CCV:** canines Coronavirus; **FECV:** felines enterales Coronavirus; **FIPV:** felines infektiöses Peritonitis-Virus; **HCoV-229E:** humanes respiratorisches Coronavirus; **HCoV-OC43:** humanes respiratorisches Coronavirus; **HEV:** porcines haemagglutinierendes Enzephalomyelitis-Virus; **IBV:** aviäres infektiöses Bronchitis-Virus; **MHV:** murines Hepatitis-Virus; **PRCoV:** porcines respiratorisches Coronavirus; **RbCoV:** Kaninchen Coronavirus; **SARS-CoV:** severe acute respiratory syndrome-Coronavirus; **SDAV:** Sialodakryadenitis-Virus; **TCV:** Truthahn-Coronavirus; **TGEV:** porcines transmissibles Gastroenteritis-Virus;

2.3 Coronaviren der Katze

Die feline Coronaviren wurden ursprünglich in zwei Stämme eingeteilt. Es wurde postuliert, dass der eine Stamm eine milde Enteritis verursacht, während der andere die meist tödlich verlaufende Feline Infektiöse Peritonitis (FIP) auslöst.

Die eine milde Enteritis auslösenden Viren bezeichnete man als Feline Enterale Coronaviren (FECV), die eine FIP auslösenden Viren als FIP-Viren (FIPV). Diese beiden Stämme konnten weder serologisch noch morphologisch voneinander unterschieden werden. Da sie sich aber biologisch unterschieden, wurden diese beiden Typen auch „Biotypen“ genannt (Vennema, 1999).

Zunächst wurde beobachtet, dass FIP-Fälle häufig einer ausgedehnten FECV-Infektion folgten. Deshalb wurde von Pedersen und Floyd (1985) die These aufgestellt, dass die Entstehung von FIP auf eine Mutation des FECV zurückzuführen ist, welche während der FECV-Replikation auftritt. Herrewegh et al. (1995a) kamen durch die Untersuchung der „avirulenten“ FECV-UCD- und 79-1683-Stämme und deren höheren Ähnlichkeit zu „virulenten“ FIPV-Stämmen als untereinander, zu dem selben Ergebnis. Auch Poland (1996) bestätigte diese Hypothese. Vennema et al. (1998) gehen von einer Deletion im ORF 3c und/oder im ORF 7b aus.

Untersuchungen am Genom von FCoV-Isolaten zeigten, dass sich in räumlicher Nähe sogenannte „genetische Cluster“ bilden. Das bedeutet, dass FECV/FIPV-Isolate von Tieren aus einem Bestand zu über 97 % genetisch identisch sind, jedoch deutlich von FECV/FIPV-Isolaten aus geografischer Distanz abweichen, was einen gemeinsamen Virusvorfahren für die einzelnen „Cluster“ wahrscheinlich macht (Vennema, 1999; Kiss et al., 2000b).

Wie bei anderen plus Strang RNS Viren liegt auch bei Coronaviren eine hohe Mutationsrate vor, die auf eine hohe Fehlerquote der RNS-Polymerase zurückzuführen ist: neben Punktmutationen kommt es auch häufig zu RNS-Rekombinationen.

In den Organen eines infizierten Tieres, selbst aus Plaques von aufgereinigten FCoV-„Stocks“, treten FCoV mit nah verwandtem, aber unterschiedlichem Genom auf. In Zusammenhang mit FCoV wird daher von einer „Quasispezies“ — einer Mutationswolke — gesprochen (Kiss et al., 2000a).

Die meisten Variationen im Hinblick auf eine Quasispezies wurden mittels PCR in der für das S-Protein kodierenden Region und um einiges geringer in der für das N-Protein kodierenden Region gefunden (Gunn-Moore et al., 1999).

Aufgrund dieser neueren Erkenntnisse distanziert man sich heute von der scharfen Trennung der FEC-Viren und FIP-Viren in zwei unterschiedliche Biotypen. Vielmehr vereinigt man beide unter dem Begriff „Quasispezies“ mit unterschiedlicher Virulenz (Gunn-Moore et al., 1999).

Bei FCoV werden 2 Serotypen unterschieden:

Serotyp I-Viren zeigen im Gegensatz zu Serotyp II-Viren im allgemeinen keine Neutralisation mit anti-CCV-Serum (Vennema, 1999).

Serotyp II-Viren lassen sich, wie das CCV, gut in der Gewebekultur kultivieren, Serotyp I-Viren dagegen nicht. Bei einem Vergleich der Gensequenzen des Serotyps I und II des FCoV und des CCV, stellte sich heraus, dass die Serotyp II Viren S-Protein-Gene von CCV besitzen. Dies erklärt auch die Neutralisation von Serotyp II des FCoV mit Antiseren gegen CCV.

Jedoch wurde anhand der Sequenzierung des 7b-Gens, lokalisiert am 3'-Ende des FCoV- und des CCV-Genoms, bewiesen, dass die Serotypen I und II des FCoV eine vom CCV abgegrenzte Gruppe bilden (Herrewegh et al., 1995a).

Der Serotyp II ist nämlich durch Rekombination von Serotyp I FCoV und CCV entstanden (Herrewegh et al., 1995a; Vennema, 1999).

Die Einteilung in die unterschiedlichen Serotypen hat keinerlei Bedeutung für die Virulenz der jeweiligen Viren. Sowohl Serotyp I als auch II enthalten Vertreter, die eine FIP auslösen können. In Österreich lag die Prävalenz des Serotyps I bei 86 % und in der Schweiz bei 83 %. In Afrika war die Prävalenz des Serotyps I bei nicht domestizierten Katzen (z. B. Geparden) höher als die des Serotyps II. Ebenso waren die Erkrankungen an FIP in den genannten Ländern und in Japan häufiger dem Serotyp I zuzuschreiben als dem Serotyp II (Kennedy et al., 2003; Benetka et al., 2004; Kummrow et al., 2005).

2.4 FIP

2.4.1 Epizootiologie der FIP

Für eine FCoV-Infektion und auch für die Ausbildung einer FIP-Erkrankung sind sowohl Hauskatzen anfällig als auch nicht domestizierte Feliden wie Geparden

(*Acinonyx jubatus*), Löwen (*Panthera leo*), Tiger (*P. tigris*), Jaguar (*P. onca*), Leoparden (*P. pardus*), Sandkatzen (*Felis margarita*), Pumas (*F. concolor*), Karakals („Wüstenluchs“) (*Caracal caracal*) und Luchse (*Lynx lynx*) (Roelke et al., 1993; Watt et al., 1993; Paul-Murphy et al., 1994; Kennedy et al., 2003).

In Spanien wurde 2006 über eine Erkrankung von 9 Frettchen berichtet, die der FIP bei Katzen äußerst ähnelte. Die Entzündungsmuster glichen sich sehr, wenn auch bei den Frettchen nicht immer ein sichtbarer Bezug zu Gefäßen vorlag, wie es bei der FIP bei Katzen normalerweise der Fall ist. Immunhistologisch wurden Coronaviren in den typischen Veränderungen der Frettchen nachgewiesen (Martinez et al., 2006; Martinez et al., 2008).

Bei dem infektiösen Agens der Frettchenerkrankung handelte es sich aufgrund des nachweisenden monoklonalen Antikörpers um ein Coronavirus der Antigengruppe I (Martinez et al., 2008). Ob es sich jedoch um ein Felines, das enterale Frettchencoronavirus oder ein neues Coronavirus handelte, bleibt abzuwarten.

Bei Hauskatzen kommt das Virus vor allem dort endemisch vor, wo viele Tiere Wasser und Fressnapfe sowie Katzent Toiletten teilen (z. B. Zuchtbestände, Tierheime, Tierpensionen, Tierhandlungen) (Kiss et al., 2000b).

Einzelne gehaltene Katzen in Hauskatzenpopulationen weisen zu 10-50 % FCoV-Antikörper auf, in größeren Haltungen (Tierheime und Zuchten) liegen die Zahlen bei 80-90 % (Pedersen, 1976a; Pedersen et al., 1981a; Pedersen et al., 1981b; Sparkes et al., 1992). In Katzenpopulationen mit ein oder zwei älteren Katzen liegt die FIP-Mortalitätsrate bei 0,02 %, während sie in größeren, auf engem Raum gehaltenen Katzensgruppen, in denen auch ein oder zwei ältere Katzen sind, bei 5 % liegt (Addie et al., 1995).

Somit ist die Morbidität der FIP als niedrig anzusehen (Pedersen, 1983), während die Letalität bei fast 100 % liegt (Pedersen et al., 1981b; Pedersen, 1983; Hök, 1993a).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das von niedrig- zu hochvirulent mutierte Virus nicht von einem Tier zum anderen übertragen wird, sondern meist die Mutation in der einzelnen Katze auftritt (Addie et al., 1995; Herrewegh et al., 1995a; Poland et al., 1996; Vennema et al., 1998). Unter besonderen Umständen scheint jedoch auch die horizontale Übertragung eines hochvirulenten mutierten FCoV in FCoV-negativen Katzenpopulationen möglich zu sein (Leukert, 2002).

Die Mutationsrate scheint von folgenden Faktoren beeinflusst zu werden:

- 1) von der FCoV-Replikationsrate (Poland et al., 1996) und

2) von der angeborenen oder erworbenen Resistenz einer Rasse, Katzenlinie oder individuellen Katze gegenüber dem mutierten Virus (Poland et al., 1996; Foley et al., 1997a, 1997b).

Foley et al. sprechen von einer „Triade der FIP-Risikofaktoren“. Dazu zählen:

1) eine eng zusammenlebende Katzenpopulation, in der eine fäkal-orale Übertragung leicht möglich ist,

2) chronische Virusausscheider und

3) ein hoher Prozentsatz an empfänglichen Tieren (Foley et al., 1997a).

Dass die Art der Haltung und das Management einen Einfluss auf die Prävalenz von FCoV haben, war ebenso bei Geparden in Namibia und Südafrika deutlich zu sehen. Hier zeigten sich große Unterschiede beim RNS-Nachweis von FCoV in Abhängigkeit von der jeweiligen Haltungsart.

Diejenigen Gruppen in Namibia, bei denen weniger FCoV-RNS nachgewiesen wurde, waren Wildfänge. Diese Tiere lebten in kleinen Gruppen auf einer Fläche von 10-50 ha mit wenig oder gar keinem Kontakt zu Nachbartieren.

Die Gruppe der Geparden in Südafrika dagegen, die in Gefangenschaft aufgezogen worden war, lebte in größeren Gemeinschaften mit mehr Kontakt zu anderen Gepardengruppen und anderen Tieren. Bei ihnen wurden höhere FCoV-RNS-Mengen nachgewiesen. Die Prävalenz einer FIP-Erkrankung war jedoch sowohl in Namibia als auch in Südafrika recht gering (Kennedy et al., 2003).

Die Aufnahme des Virus erfolgt oronasal, wobei die orale Aufnahme wahrscheinlich die größere Rolle spielt (Hoshino und Scott, 1980; Pedersen et al., 1981a; Herrewegh et al., 1995b; Vennema et al., 1995; Addie et al., 1996; Poland et al., 1996).

Früher ging man davon aus, dass sich das FCoV mit niedriger Virulenz (ehemals FECV) vom FCoV mit höherer Virulenz (ehemals FIPV) dadurch unterscheidet, dass es auf die Epithelzellen vor allem der hinteren Darmabschnitte (Ileum, Kolon, Rektum) beschränkt bleibt. Das FCoV höherer Virulenz dagegen hätte die Eigenschaft, Makrophagen zu infizieren und eine Virämie zu verursachen (Pedersen et al., 1981b; Pedersen, 1983, 1987a). Gunn-Moore et al. (1998) und andere Wissenschaftler belegten jedoch, dass sowohl das FCoV mit niedriger Virulenz als auch das mit höherer Virulenz eine Virämie verursachen (Herrewegh et al., 1995b; Gunn-Moore et al., 1998; Kipar et al., 1999; Meli et al., 2004; Can-Sahna et al.,

2007). Diese scheint also keine Prädisposition für die Entwicklung einer FIP darzustellen (Kennedy et al., 1998).

Außerdem wurden klinisch gesunde Katzen entdeckt, die das Virus länger als 9 Monate nach der Infektion (intermittierend) ausschieden und über 12 Monate lang eine Virämie aufwiesen, was als „carrier state“ bezeichnet wird (Addie und Jarrett, 2001). Diese chronisch infizierten asymptomatischen Träger scheinen das Reservoir für endemische Infektionen zu sein (Herrewegh et al., 1997).

Kipar et al. bewiesen mittels „Reverse Transkriptase PCR“ (RT-PCR), dass höher virulente FCoV eine größere Virenlast produzierten als niedrig virulente (Kipar et al., 2006). Simons et al. (2005) wiesen replizierende Viren mittels mRNS-PCR nach und kamen zu dem Ergebnis, dass von den in der Sektion als an FIP-erkrankt eingestuft Katzen 93 % mRNS-positiv waren, von den untersuchten gesunden Katzen aber nur 5 %.

In Folge einer höheren Vermehrungsrate von FECV ist eine größere Mutationswahrscheinlichkeit, auch für das Auftreten einer FIP-induzierenden Mutation, vorhanden. Gründe für die erfolgreichere Produktion des hochvirulenten FCoV könnten eine höhere Effektivität im Infizieren von Peritonealmakrophagen und im Replizieren in diesen Zellen sein (Stoddart und Scott, 1989). Eine andere Möglichkeit wäre, dass Katzen, die an FIP erkranken, eine reduzierte „viral clearance“ besitzen. Hinweise darauf lieferte eine Studie, die bei an FIP erkrankten Katzen im Endstadium eine Immunsuppression beobachtete, während die Menge der viralen RNS im Blut anstieg (de Groot-Mijnes et al., 2005).

Das Virus wird vor allem mit den Fäzes ausgeschieden, was darauf hindeutet, dass sich das Virusreservoir beim Tier im hinteren Darmabschnitt befindet. Immunhistologisch wurde dies auch bestätigt (Hoshino und Scott, 1980; Herrewegh et al., 1997). Weitere Ausscheidungsarten, z. B. mit Urin oder Augensekret, sind nachgewiesen worden (Hardy und Hurvitz, 1971). Hök (1993b) wies mittels eines Isolationsversuchs eine intrauterine Infektion nach.

Rohrbach et al. (2001) stellten mit Hilfe einer retrospektiven Studie fest, dass für junge (6 Monate bis zu 2 Jahre alte), reinrassige, nicht kastrierte Katzen eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit besteht, an FIP zu erkranken. Die höchsten Zahlen an FIP-Erkrankungen wurden in den Monaten Januar bis April beobachtet.

Die Angaben zu Rassendispositionen sind uneinheitlich. Laut einer aktuellen Studie gibt es einzelne Rassen, die ein signifikant höheres Risiko besitzen, an FIP zu

erkranken. Dazu gehören Birmakatten, Abessinier, Bengalkatten, Ragdoll und Rexkatten (Pesteanu-Somogyi et al., 2006). In einer früheren Studie wurde Siamkatten eine Disposition attestiert (Wolfe und Griesemer, 1971). Hierbei muss berücksichtigt werden, dass v. a. Rassekatten zur Zucht verwendet und folglich nicht kastriert werden. Ihre Aufzucht und Haltung findet meistens in Mehrkattenhaushalten mit höherer Bestandsdichte statt. Zusätzlich werden regelmäßig neue Katzen eingeführt. Dies sind alles Faktoren, die eine FCoV-Infektion und eine FIP-Erkrankung begünstigen.

Da manche Rassen mehr zu einer FIP-Infektion neigen als andere und auch Geparden, die einen relativ kleinen Genpool besitzen, ein höheres Risiko tragen, ist eine genetische Komponente nicht von der Hand zu weisen. Andererseits scheint es Rassen zu geben (wie z. B. Maine Coon, Perser), die möglicherweise aufgrund noch unbekannter schützender Faktoren einer FIP-Erkrankung eher widerstehen (Kiss et al., 2000b; Pesteanu-Somogyi et al., 2006).

2.4.2 Klinische Symptomatik, pathologisch-anatomische und histologische Befunde der FIP

Die Krankheitssymptome einer Feline Infektiösen Peritonitis beginnen meist nach einer extrem stressreichen Zeit, z. B. bei sehr jungen Katzen kurze Zeit nach Abgabe durch den Züchter oder das Tierheim. Im Anfangsstadium sind die Krankheitsanzeichen relativ unspezifisch wie z. B. Apathie, Gewichtsabnahme, therapieresistentes rezidivierendes Fieber, Ikterus und Appetitlosigkeit (Ward et al., 1974; Pedersen, 1987b; Rohrer et al., 1993). Der Krankheitsverlauf ist progressiv und meist fatal. Das fortgeschrittene Krankheitsbild richtet sich nach der jeweiligen Verlaufsform.

Aufgrund des bei einer der Verlaufsformen auftretenden Aszites wird die FIP häufig in eine feuchte, d. h. exsudative, und eine trockene, d. h. granulomatöse Form, eingeteilt (Wolfe und Griesemer, 1966; Montali und Strandberg, 1972; Ward et al., 1974; Hayashi et al., 1977). Diese Einteilung ist eher irreführend und nur im klinischen „Jargon“ nachzuvollziehen (Berg et al., 2005). Denn beide Formen weisen Granulome auf, nur besteht bei der feuchten Form noch zusätzlich eine exsudative Peritonitis bzw. Pleuritis. Treffender müsste von einer FIP mit und ohne Exsudation gesprochen werden.

Bei jüngeren Tieren ist die exsudative Form meist mehr verbreitet als bei älteren und tritt viermal häufiger als die trockene Verlaufsform auf (Rohrer et al., 1993). Die exsudative Form ist leichter zu diagnostizieren aufgrund des typischen bernsteinfarbenen, fadenziehenden und an Luft schnell gelierenden Bauchhöhlenergusses, der oft mit Fibrinschleiern durchsetzt ist (Wolfe und Griesemer, 1966, 1971; Ward et al., 1974; Pedersen, 1987b). Der Erguss ist sehr proteinreich und enthält 1600 bis 25000 oder mehr Leukozyten pro Mikroliter (Pedersen, 1987b). Sein Volumen kann von wenigen Millilitern bis zu einem Liter variieren. Bei 25 % aller exsudativen FIP-Fälle treten auch Pleuraergüsse auf (Neu und Pfeiffer, 1985).

Bei an FIP erkrankten Katzen bestehen die Läsionen aus unterschiedlich stark ausgeprägten, granulomatös-nekrotisierenden Entzündungen. Die histopathologischen Befunde zeichnen sich durch Fibrinlagen auf der Serosa mit eingelagerten Entzündungszellen (Makrophagen, Lymphozyten, wenige neutrophile Granulozyten) und Mesothelzell-Hyperplasie aus (Wolfe und Griesemer, 1971; Ward et al., 1974; Pedersen, 1987b). Die Alterationen sind meistens gefäßassoziiert und in Verbindung mit fibrinös-nekrotisierenden Vaskulitiden zu beobachten (Montali und Strandberg, 1972; Hayashi et al., 1977; Weiss und Scott, 1981c).

Bei der exsudativen Form werden derartige Läsionen in Reihenfolge der Häufigkeit in Peritoneum, Gehirn, Leber, Pleura, Nieren, Mesenteriallymphknoten und Milz beobachtet (Wolfe und Griesemer, 1966).

Die abdominalen Läsionen der exsudativen Form der FIP sind meist oberflächlich, können sich aber auf das darunter gelegene Parenchym ausbreiten und die Entzündungsherde Ausmaße von 1 mm bis zu 10 cm im Durchmesser oder mehr annehmen (Pedersen, 1987b).

Bei der trockenen Form sind die FIP-typischen Läsionen häufiger in Nieren, Peritoneum (Bauchdecke, Zwerchfell, Omentum), Mesenteriallymphknoten, Leber, Pankreas, Milz, Gehirn, Meningen und Auge zu finden. Sind Pankreas, Nieren oder Leber mit betroffen, können endokrine Störungen auftreten (Montali und Strandberg, 1972; Hayashi et al., 1980; Pedersen, 1987b). Bei der trockenen Form überwiegen die Pyogranulome, deren Größe vom jeweils involvierten Organ abhängt. So können Veränderungen in den Nieren eine Größe von mehr als 5 cm im Durchmesser erreichen (Wolfe und Griesemer, 1971; Ward et al., 1974; Pedersen, 1987b). Sie befinden sich meist in der Nähe von kleinen Gefäßen und sind häufig mit Phlebitiden

und Periphlebitiden assoziiert (Weiss und Scott, 1981a; Pedersen, 1987b). Bei 40 % der Fälle der trockenen Form treten ZNS-Veränderungen auf, häufig in Verbindungen mit Augenläsionen (ca. 35 %). Die Erstgenannten führen häufig zu unspezifischen Ausfallerscheinungen des Zentralnervensystems wie z. B. Nystagmus, Tremor, Ataxie und Paresen (Kornegay, 1978). Die Augenläsionen sind meist charakterisiert durch nekrotisierende und pyogranulomatöse Entzündungen in Iris und Ziliarkörper, was auch zur Trübung des Kammerwassers und zum Austritt von fibrinreichem Exsudat in die vordere Augenkammer führen kann. In der Regel ist die Uvea ins Entzündungsgeschehen mit einbezogen (diffuse Panuveitis) (Slauson und Finn, 1972; Weber, 2000).

Die FIP-typischen Veränderungen wurden von Kipar et al. (1998) mittels Histologie und Immunhistologie systematisch in fünf verschiedene Kategorien eingeteilt:

1) diffuse Alterationen auf serösen Oberflächen:

- Nekrosen und aktivierte Mesothelzellen mit einzelnen FCoV-enthaltenden Makrophagen oder
- Lagen von präzipitiertem Exsudat mit einer dünnen Bande subkapsulärer B-Zellen. Diese Lagen enthalten einzelne Plasmazellen, die teilweise FCoV-Antikörper bilden.

2) Granulome mit Nekrosen:

- im Zentrum des Granuloms befindet sich eine Nekrose, die umgeben wird von einer Ansammlung FCoV-tragender Makrophagen. In der Peripherie sind einzelne Plasmazellen, B-, T-Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten zu beobachten. Diese Entzündungsform kommt häufiger in den diffusen Veränderungen der serösen Häute, im Omentum und in den Parenchymenten vor.

3) Granulome ohne (ausgedehnte) Nekrosen:

- Sie enthalten meist eine geringere Anzahl von Makrophagen als die Granulome mit Nekrose. B-Lymphozyten und Plasmazellen bilden einen breiten Rand. Im gesamten Granulom sind wenige neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten zu sehen. Diese Granulome kommen am häufigsten in der Niere vor.

4) Fokale und perivaskuläre lymphoplasmazytäre Infiltrationen:

- Sie kommen meist im Omentum und in der Leptomeninge vor. Manchmal sind sie auch im Gehirn von Katzen mit granulomatöser Leptomeningitis zu sehen.

5) granulomatös-nekrotisierende Vaskulitis:

- Sie ist gekennzeichnet durch Makrophagen, die sich in der Immunhistologie beim Nachweis von FCoV stark anfärben lassen. Diese Art der Läsionen wird am

häufigsten in der Leptomeninx und in den Nieren gefunden (Weiss und Scott, 1981a; Kipar et al., 1998).

Auch das hämolymphatische Gewebe ist bei FIP-Katzen in das Krankheitsgeschehen involviert. Es wird sowohl von einer lymphatischen Depletion als auch von einer reaktiven Hyperplasie in ein und derselben Katze berichtet (Wolfe und Griesemer, 1971; Montali und Strandberg, 1972; Haagmans et al., 1996; Euler, 2005).

2.4.3 Pathogenese der FIP

Wie zuvor erwähnt, hat das FCoV sein Reservoir in den Epithelzellen des hinteren Darmabschnitts der infizierten Katze. Doch für die Verteilung und auch Replikation des Virus im gesamten Körper werden Monozyten und Histiozyten zu Zielzellen des Virus (Stoddart und Scott, 1988, 1989; Berg et al., 2005). Außerdem scheint das aktivierte Stadium dieser Zellen Vaskulitiden auszulösen (Kipar et al., 2005).

In früheren Arbeiten gingen die Autoren davon aus, dass der Entstehung der Vaskulitiden/Granulome eine Typ III-Hypersensitivität zu Grunde lag (Jacobse-Geels et al., 1980; Weiss und Scott, 1981c; Paltrinieri et al., 1998a): Mittels Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden sowohl in den Gefäßläsionen als auch in den granulomatös-nekrotisierenden Läsionen in der Leber Fibrinogen und die dritte Komponente des Komplementsystems (C3) nachgewiesen. In den mononukleären Entzündungszellen wurde FCoV-Antigen, Immunglobulin G (IgG) und Komplement dargestellt. Außerdem wiesen Katzen mit FIP und solche, die eine FIP entwickelten, zirkulierende, FCoV-spezifische Immunkomplexe auf (Jacobse-Geels et al., 1980; Weiss et al., 1980; Weiss und Scott, 1981c). Diese Fakten unterstützen bei gleichzeitigem Vorhandensein von Vaskulitiden und nachgewiesenen Immunkomplexen in glomerulären Gefäßen sowie chronischen Glomerulonephritiden in einigen Fällen den Verdacht einer Typ-III-Hypersensitivitätsreaktion (Jacobse-Geels et al., 1980; Hayashi et al., 1982).

Paltrinieri et al. (1998b) waren dagegen der Meinung, dass aufgrund des hohen Anteils an CD4-positiven Zellen sowie der Präsenz von Granulozyten und Makrophagen in den Läsionen eine Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktion an der Entstehung der FIP-Granulome beteiligt sei.

Kipar et al. (2005) wiesen jedoch darauf hin, dass sich die Morphologie, die Zellzusammensetzung und das Verteilungsmuster der granulomatösen Vaskulitis der FIP sehr von jeder anderen immun vermittelten Vaskulitis in Tier und Mensch unterscheiden. So zeigten sie auf, dass ältere Gefäßentzündungsprozesse der FIP eher einen breiten Rand aus B-Lymphozyten aufweisen als eine perivaskuläre Manschette (sog. „cuffing“) aus unterschiedlichen Lymphozytentypen, die man aber bei einer Immunkomplex-Vaskulitis erwarten würde.

Gegenüber Paltrinieri et al. (1998b) geben Kipar et al. (2005) an, dass für eine Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktion zu wenige neutrophile Granulozyten beteiligt seien.

Kipar et al. (2005) gehen davon aus, dass die bei der FIP beobachteten Veränderungen vor allem auf aktivierte und mit dem FCoV infizierte, zirkulierende Monozyten zurückzuführen sind. Die Basallamina der Venen befallener Organe werden bei der Emigration der infizierten und aktivierten Monozyten durch Sekretion von Metalloproteinase B (MMP-9) abgebaut. Zudem schütten die aktivierten Monozyten Zytokine aus, welche weitere Entzündungszellen, vor allem Monozyten, anlocken, die bereits infiziert sind oder wiederum vom FCoV infiziert werden können. Auf diese Weise kann es in vielen Geweben und Organen zur Bildung von Granulomen kommen.

Es wurde vermutet, dass gegen das FCoV gerichtete Antikörper eher zu einer Beschleunigung der Erkrankung führten als zu ihrer Eindämmung. Diese These wurde von Stoddart und Scott aufgestellt, als sie eine verstärkte Infektion von feline Makrophagen durch virulente FIPV-Isolate nach vorheriger Inkubation des Virus mit Coronavirus-Antikörpern feststellten (Stoddart und Scott, 1989). Dieses Phänomen, auch unter dem Namen „antibody dependent enhancement“ (ADE) bekannt, konnte aber nur bei experimentell infizierten Katzen beobachtet werden (Pedersen und Boyle, 1980; Weiss und Scott, 1981b; Boyle et al., 1984; Vennema et al., 1990). In natura zeigten seropositive Tiere kein erhöhtes Risiko, an FIP zu erkranken. Eher schützte dieser Antikörper-Titer die Tiere vor einer Erkrankung an FIP (Addie et al., 1995). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Infektion mit einem FCoV-Stamm die Tiere gegenüber einer Superinfektion mit anderen FCoV-Stämmen resistent macht (Herrewegh et al., 1997).

Es wird angenommen, dass sich die exsudative Form der FIP entwickelt, wenn nur eine humorale aber keine zelluläre Immunantwort durch die Infektion hervorgerufen wird (Pedersen et al., 1981a). Bei der trockenen Form dagegen scheint wenigstens

zum Teil die zelluläre Immunantwort noch zu funktionieren (Pedersen und Black, 1983). Diese inkomplette Immunität scheint die Virusreplikation und –verteilung etwas zu begrenzen (Pedersen, 1987b). De Groot-Mijnes et al. (2005) untermauern die Hypothese von Pedersen, indem sie davon ausgehen, dass das FCoV eine T-Zell-Depletion induziert, woraus eine ungehinderte Virusreplikation resultiert. Takano et al. (2007) vermuteten, dass der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), der von den virusinfizierten Makrophagen produziert wird, T-Zell-Apoptosen induziert.

Wie zuvor in Kapitel 2.4.2 erwähnt, kann eine an FIP erkrankte Katze sowohl eine reaktive Hyperplasie als auch eine Depletion des lymphatischen Gewebes aufweisen. Dean et al. (2003) beobachteten eine lymphatische Depletion nur in Geweben, in denen auch Virusreplikation stattfand. In den nicht betroffenen lymphatischen Geweben kam es zu einer Hyperplasie. Zugleich wiesen sie in den depletierten Geweben einen niedrigen Gehalt an Interleukin (IL) 4 und 12 und einen hohen Gehalt an IL 10 nach. Zusätzlich war dort die Expression von TNF- α erhöht. Kiss et al. (2004) stellten die Hypothese auf, dass ein hoher TNF- α -Spiegel gekoppelt mit einem niedrigen Interferon (IFN)-Level eine FIP-Erkrankung begünstigt, der umgekehrte Fall aber eher auf eine Immunität hinweist.

2.5 Postmortale Diagnose der FIP

Zur letztendlichen Bestätigung einer FIP-Erkrankung und Sicherstellung der Diagnose ist bis heute der Nachweis des Virus in den von ihm typisch veränderten Geweben (Granulome) bzw. infizierten Zellen (Makrophagen) ausschlaggebend (Tammer et al., 1995).

Als häufigste Techniken werden dafür zur Zeit die Immunhistologie (IH) (Tammer, 1996; Kipar et al., 1998) und die Immunfluoreszenz (IF) (Weiss und Scott, 1981b; Hök, 1993a) durchgeführt.

Immunhistochemische Methoden, denen die IF und die IH angehören, dienen dem Nachweis und der Lokalisation von Antigenen in Geweben und Zellen mit Hilfe spezifischer Antikörper. Beide Vorgehensweisen verwenden die gleiche Grundtechnik: Ein Antigen wird mittels eines gegen es selbst gerichteten Antikörpers und verschiedener Markersysteme nachgewiesen – bei der IF mittels

fluoreszierender Stoffe, bei der IH durch die enzymatische Umwandlung eines farblosen Substrates in eine farbige Substanz (Lichtmikroskop).

Die erfolgreiche Immunhistologiediagnostik ist sowohl von der Menge als auch von der Intensität des Signals des nachzuweisenden Agens abhängig. Daher ist es wichtig, beide Merkmale zu optimieren.

2.5.1 Vorbehandlungen der zur Immunhistologie verwendeten

Schnitte

Der monoklonale Antikörper reagiert mit einem bestimmten Epitop eines Proteins, das sowohl durch die Primär- und Sekundär- als auch die Tertiärstruktur charakterisiert ist. Die Fixierung der Gewebe verändert die Epitope der Proteine häufig, so dass sie von spezifischen Antikörpern nicht mehr erkannt werden können. Bei der Verwendung von Formalin kommt es z. B. zu Quervernetzungen innerhalb der Polypeptidketten und zwischen ihnen, was zur Ausbildung von Quervernetzungen zwischen Amido- und Aminogruppen, alkoholischen Hydroxylgruppen und aromatischen Ringstrukturen führt. Disulfidreste werden zu Sulfhydrylgruppen reduziert, die wiederum unter Einwirkung von Formaldehyd quer vernetzende Methylenbindungen ausbilden (Baker, 1985; Ramos-Vara, 2005). Es wurden verschiedene Techniken entwickelt, um diese Vernetzungen - „Antigenmaskierung“ genannt - wieder aufzubrechen, aber dabei möglichst nicht das nachzuweisende Epitop weiter zu verändern. Diese Praktiken werden unter dem Begriff „Antigen Retrieval“ (AR) – **Demaskierung der Antigene** – zusammengefasst. Die gebräuchlichsten Verfahren zur Demaskierung der Epitope beruhen auf der Behandlung mit Enzymen oder Hitze (Cattoretti et al., 1993; Pileri et al., 1997).

Die **enzymatische Vorbehandlung** der histologischen Schnitte wurde von Huang et al. (1976) eingeführt. Basierend auf ihren Ergebnissen mit Trypsin wurden weitere Untersuchungen mit Enzymen wie Trypsin, Proteinase K und Pepsin betrieben (Pinkus et al., 1985; Battifora und Kopinski, 1986).

Die enzymatische Vorbehandlung beruht auf dem proteolytischen Abbau der Proteine. Trypsin spaltet als Endopeptidase bevorzugt an der Carboxylseite von Lysin- und Argininresten. Sein Wirkungsoptimum liegt bei einem pH-Bereich von 7 bis 9 und einer Temperatur von 37 °C (Neumüller, 1973).

Die Nachteile der enzymatischen Verdauung bestehen darin, dass es eine relativ kleine Anzahl an geeigneten Antigenen gibt und dass möglicherweise die Gewebsmorphologie verändert wird und die Epitope zerstört werden (Ordonez et al., 1988). Zusätzlich erhöht sich das Risiko des Abschwimmens der Schnitte.

Das auf **Hitze beruhende Verfahren** wurde bereits durch Fraenkel-Conrat et al. (1947) eingeführt. Sie zeigten auf, dass bei Temperaturen um 120 °C oder in Anwesenheit hoher Alkalimetallionen-Konzentrationen formalintypische Proteinvernetzungen verändert werden.

Außerdem scheinen hohe Temperaturen bei der Vorbehandlung die Unterschiede in der Signalintensität zwischen gut fixiertem Gewebe im Außenbereich und schlecht fixiertem Gewebe im Zentrum bemerkenswert zu verringern (Pileri et al., 1997).

Diese Erkenntnisse führten zu der Entwicklung so genannter Antigen-Retrieval-Methoden, bei denen formalinfixierte Schnitte in bestimmten (Metall-)Salzlösungen erhitzt werden, um maskierte Epitope freizulegen (Boon und Kok, 1989). Demzufolge bieten verschiedene Firmen so genannte „Antigen-Retrieval-Lösungen“ oder „Enhancer“ an, die meistens aus Metallsalzlösungen bestehen und mit oder ohne Erhitzen eingesetzt werden können. Die genauen chemischen Mechanismen sind noch nicht geklärt. Man vermutet eine Hydrolyse der durch Formalin induzierten Quervernetzungen (Shi et al., 1997), auch scheinen der pH-Wert und die Inkubationszeit eine wichtige Rolle zu spielen (Shi et al., 2001).

Es muss weiterhin bedacht werden, dass die Verwendung eines bestimmten AR nicht nur von dem nachzuweisenden Antigen, sondern auch von dem verwendeten Antikörper abhängt, wie Ramos-Vara und Beissenherz herausfanden (Ramos-Vara und Beissenherz, 2000).

Sie kamen zu folgendem Ergebnis: Die meisten eine Vorbehandlung benötigenden Antigene wurden nach einer Behandlung mit 0,01 M Zitratpuffer (pH-Wert 6,0) bei 90 – 95 °C im Dampf- oder Wasserbad mit ca. 20 Minuten Inkubationszeit gut nachgewiesen und zugleich blieb die Zellmorphologie gut erhalten. Puffer mit höherem pH-Wert oder Lösungen, die 1 mM EDTA (pH-Wert 8,0) enthielten, erbrachten schlechtere Ergebnisse (Imam et al., 1995; Battifora, 1999; Hayat, 2002). Cattoretti (1993) und Pileri (1997) zeigten, dass die Darstellung von Epitopen auch von den verwendeten Antikörpern abhängt.

Um eine optimale Antigendarstellung mit verschiedenen Antikörpern am formalinfixierten und paraffineingebetteten Material zu ermöglichen, sind entweder

enzymatische und/oder hitzevermittelte Vorbehandlungen mit unterschiedlichen Lösungen (Metallsalzlösungen, organische und karboxylathaltige Lösungen) notwendig (Walter und Hahn, 1999).

Eines meiner Ziele war es, die von Walter und Hahn (1999) vorgeschlagenen Verfahren auf meine zu testenden monoklonalen Antikörpern zu übertragen und zu optimieren:

Daher wurden in dieser Doktorarbeit Zitratpuffer mit zwei unterschiedlichen pH-Werten als Vertreter der karboxylathaltigen Lösungen und Trypsin als Vertreter der enzymatischen Lösungen getestet. „DAKO[®] Target Retrieval Solution“ (DTRS), „Target unmasking fluid (TUF)[®]“ und „Linaris[®] Histosafe Enhancer“ (LHE) sind kommerzielle Lösungen, deren Bestandteile nicht bekannt sind. Sie werden in unserer Routinediagnostik mit gutem Ergebnis eingesetzt und wurden daher auch in dieser Arbeit miteinbezogen. Sie sind wahrscheinlich zu den Metallsalzlösungen zu zählen.

2.5.2 Unspezifische Hintergrundfärbung

Im Allgemeinen versteht man unter einer unspezifischen Hintergrundfärbung die Farbreaktionen in einem Gewebe, die nicht das Resultat einer spezifischen Antigen-Antikörper Bindung sind.

Der Grad der Hintergrundfärbung hängt von mehreren Faktoren ab:

Zunächst stellen ungenügendes **Entparaffinieren**, unvollständiges Durchdringen des Gewebes durch das **Fixans** oder Überfixierung eine Ursache dar (Pileri et al., 1997; Werner et al., 2000).

Ein weiterer Aspekt sind die **verwendeten Antikörper** selbst:

Bei polyklonalen Antikörpern (und auch selten bei monoklonalen, die aus einem Aszites stammen) spielen häufig unspezifische Bindungen zwischen Serumbestandteilen und Gewebestrukturen infolge von hydrophoben oder elektrostatischen Wechselwirkungen (z. B. an Kollagene oder lektinartige Membranbestandteile) eine wichtige Rolle (Walter und Hahn, 1999; Ramos-Vara, 2005). Dies kann aber durch Auftragen einer neutralen Proteinlösung/Normalserum vor dem Primärantikörper vermindert oder sogar verhindert werden.

Ferner stellen die **Vorbehandlungen** einen wichtigen Einflussfaktor auf die Hintergrundfärbung dar.

Pileri et al. (1997) beobachteten, dass durch unterschiedliche Vorbehandlungen die Hintergrundfärbung vermindert werden kann. So ist bei der Streptavidin-Biotin-Methode die Hintergrundfärbung bei Hitze-induzierter Antigendemaskierung geringer als bei der Verwendung von Proteasen. Andererseits berichten Bussolati et al. (1997), dass AR-Prozeduren mittels Mikrowelle oder Dampfkochtopf die Reaktivität des endogenen Biotins wieder herstellen, was zu einer feinen granulären zytoplasmatischen braunen Färbung führt. Diese müsste mit einer nachfolgenden Avidin-Biotin Behandlung wieder geblockt werden.

Auch endogen vorhandenes Biotin (vor allem in Leber, Niere, Milz, Fett, Mamma und Gehirn) kann mit dem zugefügten Avidin reagieren und so zur unspezifischen Hintergrundfärbung beitragen (Bussolati et al., 1997). Diese kann zum Teil mit einer H_2O_2 -Zugabe verringert, aber meist nicht vollkommen unterdrückt werden.

Ein großes Problem stellen auch die **endogenen Enzymaktivitäten** dar, die bei Enzym-Marker-Systemen Quellen unspezifischer Reaktionen sein können. So sind bei den (Strept-)Avidin-Biotin-Methoden die endogenen Peroxidasen, die Pseudoperoxidasereaktivität von Hämoglobin (Streefkerk, 1972; Straus, 1980) sowie die unspezifischen nichtimmunologischen Bindungsphänomene des Avidins wie zum Beispiel die Bindung an Plasma- und/oder Mastzellen, gute Beispiele (Wichmann-Schauer, 1990).

Obwohl die endogene Peroxidase-Aktivität meist schon durch die Formalinfixierung zerstört wird, hat sich zusätzlich eine Behandlung mit 0,3 %igem H_2O_2 in Methanol bewährt, die die Aktivität noch weiter reduziert (Straus, 1974, 1980).

Weitere Ursachen unspezifischer Färbungen sind negative Ladungen auf Endothelien und Kollagen, freie Aldehydgruppen und das Fc-Stück von Antikörpern. Unspezifische Ladungen, die potenzielle Protein-Bindungsstellen darstellen, können aber meist durch Präinkubation mit Seren blockiert werden (Taylor und Tandon, 1994).

Zum Teil können auch mitotische Zellen und nekrotisches Gewebe Antikörper absorbieren und so zu falsch positiven Reaktionen führen (Pelstring et al., 1991; Leong, 1993; Ramos-Vara, 2005).

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

In der Zeit von März 2002 bis Ende Februar 2005 wurden 969 Katzen routinemäßig am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen untersucht. Bei 113 dieser Katzen wurde eine FIP-Erkrankung per Immunhistologie bestätigt. Sie wurden in vier verschiedene Frischegrade eingeteilt (Definition Tabelle 3.1).

Für die **Antikörperversuchsreihe** wurden Leber und Milz von einer an FIP-erkrankten Katze verwendet, da beide Organe aufgrund ihres Gehaltes an Biotin (Leber) und endogener Peroxidase (Erythrozyten in der Milz) eine Herausforderung an die verschiedenen Nachweismethoden darstellen (Kapitel 5.2.1.2). Zusätzlich gehören sie zu den am häufigsten betroffenen Organen bei einer FIP-Erkrankung (Hayashi et al., 1980; Kipar et al., 2005).

Bei den 113 Katzen wies von den großen Parenchymenten die Niere am häufigsten FIP-typische Veränderungen auf und wurde daher als größte gemeinsame Basis für die **semiquantitative Bewertung der Reaktionsintensität** verwendet.

Zu diesem Zweck mussten die FIP-typischen Läsionen (Granulome) gleichzeitig einem bestimmten Frischegrad (Tabelle 3.1) und einer bestimmten Reaktionsintensität (Tabelle 3.6) zuzuordnen sein. Von den 54 untersuchten Nieren entsprachen 24 Granulome in 21 Nieren den aufgestellten Anforderungen (Tabelle 10.1).

Als Kontrolltiere dienten 10 Katzen aus dem gleichen Zeitraum, die an anderen Erkrankungen als FIP verstorben waren. Außerdem wurden als Kontrolltiere noch zwei SPF (specific pathogen free)-Katzen aus einem FeLV-Versuch verwendet, die FeLV-negativ geblieben waren (Büttner, 2004). Vorberichte und pathologisch-anatomische beziehungsweise pathologisch-histologische Befunde wurden den Sektionstagebüchern des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen entnommen. Tagebuch-Nummern, Alter und Geschlecht der Tiere sowie die diagnostizierte Erkrankung sind dem Anhang (Tabelle 10.4) zu entnehmen. Außerdem wurden Katzen untersucht, die zwar morphologisch dem Bild einer FIP entsprachen, bei denen jedoch mit dem Standardverfahren (Antikörper FCV3-70) immunhistologisch kein FIPV-Antigen nachgewiesen werden konnte (Tabelle 10.3).

3.1.1 Erhaltungszustand der Sektionskatzen

Die Einschätzung des Frischegrades der Sektionskatzen erfolgte durch den jeweiligen untersuchenden Pathologen anhand von morphologischen Kriterien, wie sie in der folgenden Tabelle 3.1 dargestellt sind.

Tabelle 3.1: Frischegrade nach Holznagel (1993)

GRAD	BEZEICHNUNG	ZUSTAND DES KADAVERS
I	frisch	ohne jegliche Fäulnis- und Autolyseanzeichen
II	relativ frisch	geringe Fäulnis- und Autolyseanzeichen
III	nicht mehr frisch	äußere Fäulnis- und Autolyseflecken an der Bauchwand, in der Inguinalgegend sowie innere Fäulnis- und Autolyseanzeichen
IV	faul	ausgedehnte äußere Fäulnisflecken, deutliche innere fäulnisbedingte bzw. autolytische Veränderungen, Geruchsentwicklung

3.2 Bearbeitung der Proben für die histologische und immunhistologische Untersuchung

3.2.1 Fixierung und histopathologische Präparation

Das bei den Sektionen gewonnene Gewebe wurde routinemäßig für 12-18 h in 10 %igem, ungepuffertem Formalin (Roth C. GmbH & Co KG, Karlsruhe) bei Raumtemperatur fixiert.

Nach dem Zuschnitt der Gewebeproben und Verbringen in Einbettkapseln erfolgte die Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe (von 50 % bis 96 % Alkohol, Isopropanol, Xylolersatz) und die Einbettung in reines Paraffin (Paraplast, Histo-comp®, Schmelzpunkt 56-58 °C; Vogel W. GmbH & Co KG, Gießen) im Einbettautomat TissueTec® VIP Miles Scientific, (Vogel W. GmbH & Co KG).

Von den in Paraffin eingebetteten Geweben wurden ca. 5 µm dicke Schnitte hergestellt, auf Eiweiß-Glyzerin-beschichtete StarFrost® Objektträger (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik-GmbH, Edermünde) aufgezogen und mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) gefärbt. Eine Toluidinblau-Färbung wurde angewandt, um von dem mAk 6F7 markierte Zellen genauer zu charakterisieren.

Von dem gleichen in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden auch für immunhistologische Untersuchungen Schnitte von ca. 3 µm Dicke angefertigt, auf SuperFrost® Plus Objektträger (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik-GmbH, Edermünde) aufgezogen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei Raumtemperatur für maximal 24 h für den immunhistologischen Nachweis von FCoV-Antigen.

3.3 Immunhistologie

3.3.1 Seren

3.3.1.1 Kaninchen-, Pferde-, Ratten- und Schweineserum

Das Blut gesunder Kaninchen, Pferde, Ratten und Schlachtschweine wurde nach 2-4 h Stehen bei 1500 x g für 10 min zentrifugiert, das Serum abgenommen, portioniert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Antiseren

3.3.2.1 Primärantikörper

Die verwendeten Antiseren, ihre Zielantigene und ihre Bezugsquellen sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Tabelle 3.2: Primäre Antikörper, Bezugsquellen und Zielantigene

ANTIKÖRPER/KLON	BEZUGSQUELLE	ZIELANTIGEN
Maus α-Coronavirus (Klon FCV3-70)	Custom Monoclonals Int.; West Sacramento, USA	Nukleokapsidprotein
F19-1¹	Prof. Hohdatsu, Kitasato Universität, Japan	Membranprotein
52D5²	Idexx Laboratories, Inc. Westbrook, Maine, USA	Nukleokapsidprotein
1F12²	Idexx Laboratories, Inc. Westbrook, Maine, USA	Spikeprotein
6F7²	Idexx Laboratories, Inc. Westbrook, Maine, USA	Membranprotein
Mac 387	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland	Maus α -myeloid/histiocyte Ag
Kaninchen α-Hund-IgG	Dianova GmbH, Hamburg [304-005-003]	IgG der Katze infolge Kreuzreaktion
T₁	Hirschberger ³	Oberflächenantigen von Hühner-Thymus- Lymphozyten

Ag: Antigen; α -: anti; IgG: Immunglobulin G;

¹ = freundlicherweise von Prof. Hohdatsu zur Verfügung gestellt (Hohdatsu et al., 1991)

² = von Prof. Fiscus hergestellt und freundlicherweise von IDEXX zur Verfügung gestellt (Fiscus et al., 1987a, 1987b; Fiscus und Teramoto, 1987)

³ = (Hirschberger, 1987)

Der Primärantikörper FCV3-70 wurde in einer Verdünnung von 1:60 und 1:280 (aufgrund einer anderen Charge), der Primärantikörper Mac 387 in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

Die Primärantikörper F19-1, 52D5, 1F12 und 6F7 wurden zunächst in den Verdünnungen 1:50, 1:500 und 1:2500 getestet. Nach der Auswertung der Ergebnisse wurden die Verdünnungsschritte nochmals individuell verringert und so die Verdünnung optimiert (Kapitel 4.1.1). Diese optimierten Verdünnungen für die

Kombination der jeweiligen Vorbehandlung mit der PAP-Methode wurden mit den optimierten Verdünnungen für die Kombination der jeweiligen Vorbehandlung mit der LSAB-Methode verglichen.

Die Antikörper FCV3-70, 52D5, F19-1 und 1F12 wurden zudem noch in einem „Cocktail“ miteinander kombiniert. Die Überlegung war, dadurch die verschiedenen Virusstrukturproteine des FCoV mittels einer einzigen Antikörperlösung nachweisen zu können.

3.3.2.2 Sekundärantikörper

Die verwendeten Sekundärantikörper und ihre Bezugsquellen sind in Tabelle 3.3. aufgelistet.

Tabelle 3.3: Sekundärantikörper, Bezugsquellen und Verdünnung

ANTIKÖRPER	BEZUGSQUELLE [BESTELLNUMMER]	VERDÜNNUNG
Ratte α-Maus IgG (H&L)	Dianova GmbH, Hamburg [415005100]	1:100 in TBS
Pferd α-Maus IgG, biotinyliert	Vector Laboratories [BA-20000]	1:100 in TBS
Schweine α-Kaninchen IgG (H&L)	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg, [ZO 196]	1:100 in TBS + 20 % SS

α : anti; IgG: Immunglobulin G; SS: Schweineserum; TBS: Tris buffered saline

3.3.2.3 Tertiärantikörper und Detektionssysteme

Die verwendeten Tertiärantikörper und Detektionssysteme sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

Tabelle 3.4: Tertiärantikörper/Detektionssysteme, Bezugsquellen und Verdünnung

DETEKTIONSSYSTEM	BEZUGSQUELLE [BESTELLNUMMER]	VERDÜNNUNG
PAP von der Maus	Dianova GmbH, Hamburg [223005025]	1:500 in TBS
PAP vom Kaninchen	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg [zo 113]	1:100 in TBS
HRP-Streptavidin Conjugate	Zymed Laboratories Inc. [43-4323]	1:1000 in TBS

HRP: Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase); PAP: Peroxidase anti-Peroxidase, TBS: Tris buffered saline

3.3.3 Immunhistologischer Nachweis der FCoV-Antigene

Der Nachweis der FCoV-Antigene wurde bis auf die verschiedenen Vorbehandlungen und Methoden nach derselben Vorgehensweise durchgeführt. Zur Übersicht siehe Abbildung 3.1.

Sämtliche Inkubationen wurden, sofern nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur durchgeführt.

Durchführung:

- 1) Entparaffinieren der Schnitte in Xylol-Ersatz für 10 min. Entfernen des Xylol-Ersatzes in Alkohol (2x Isopropylalkohol, 1 x 96 % und 1x 80 % Alkohol für je 3 min)
- 2) Inaktivierung der endogenen Peroxidase in 0,5 % Wasserstoffperoxid (107210, Perhydrol®, Merck) in Methanol (7342, Roth C. GmbH & Co KG) für 30 min
- 3) Waschen der Schnitte in TBS für 3x5 min (pH-Wert 7,6; Kapitel 10.2)
- 4) Jeweilige Vorbehandlung siehe 3.3.3.1
- 5) Aufbringen der Objektträger auf Coverplates™ (Shandon, Frankfurt/Main) und Einführen der Coverplates™ in die Halterung
- 6) Inkubation mit 10 %igem Rattenserum in TBS bei der PAP-Methode, mit unverdünntem Pferdeserum bei der LSAB-Methode für 10 min
- 7) Auftragen des jeweiligen Primärantikörpers in der jeweiligen Verdünnung oder des Kontrollantikörpers T₁ (gegen ein Oberflächenantigen von Hühner-Thymus-Lymphozyten gerichtet; (Hirschberger, 1987)) in gleicher Verdünnung wie die des Primärantikörpers (Negativkontrollschnitte); Inkubation der Schnitte für 18-20 h bei 4 C
- 8) Spülen der Schnitte durch Einbringen von TBS in die Coverplates™ 3x für je 5 min
- 9) Auftragen des jeweiligen Detektionssystems (Kapitel 3.3.3.2); Inkubation der Schnitte für 30 min
- 10) Spülen der Schnitte 3x für je 5 min in TBS, Entnehmen der Schnitte aus den Coverplates
- 11) Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in einer Küvette in 0,05 % 3,3'-Diaminobenzidin(-tetrahydrochlorid) (DAB, Fluka Feinchemikalien GmbH) mit 0,01 % Wasserstoffperoxid in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1; Kapitel 10.2) für 10 min
- 12) Waschen der Schnitte 3x für je 5 min in TBS und 1x5 min in Aqua dest.
- 13) Inkubation der Schnitte in Kardasewitsch-Lösung (Kapitel 10.2)
- 14) Waschen der Schnitte in Aqua dest. für 10 min

- 15) Gegenfärben mit Papanicolaou Hämatoxylin (Papanicolaou; Merck, 1:10 in Aqua dest.) für etwa 20 sec und Bläuen der Schnitte in lauwarmem Leitungswasser für 5 min
- 16) Waschen der Schnitte für 5 min in Aqua dest.
- 17) Entwässern der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe und dreimaliges Klären in Roti-Histol® für je 3 min. Anschließend überführen in Xylol
- 18) Eindecken mit Folie im Eindeckautomaten

Für den Nachweis der unterschiedlichen Antigene des FCoV wurden verschiedene monoklonale Antikörper getestet (Tabelle 3.2).

Um die für den jeweiligen monoklonalen Antikörper beste Vorbehandlung und das beste Detektionssystem herauszufinden, wurden verschiedene Vorbehandlungen (Kapitel 3.3.3.1) mit der Peroxidase-anti-Peroxidase- (PAP-) (Kapitel 3.3.3.2.1), oder der „Labeled Streptavidin-Biotin-Methode“ (LSAB-) (Kapitel 3.3.3.2.2) kombiniert und das Signal der jeweiligen Antikörper im Bezug auf RI, deren Schwankungsbreite und Hintergrundfärbung (Kapitel 3.5.2) miteinander verglichen.

Abbildung 3.1 zeigt den methodischen Ablauf des immunhistologischen Nachweises:

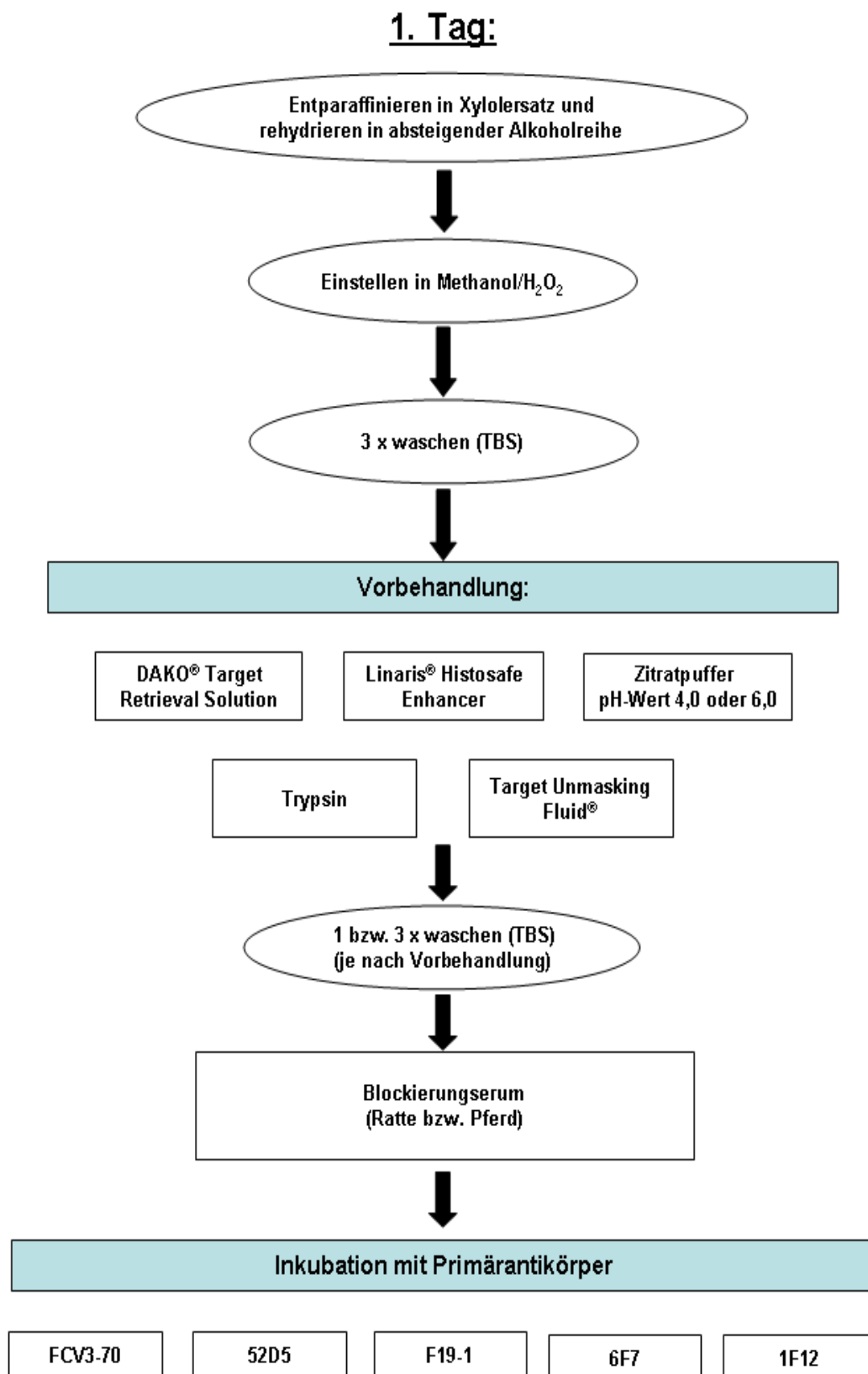


Abbildung 3.1: Methodischer Ablauf des immunhistologischen Nachweises der FCoV-Antigene

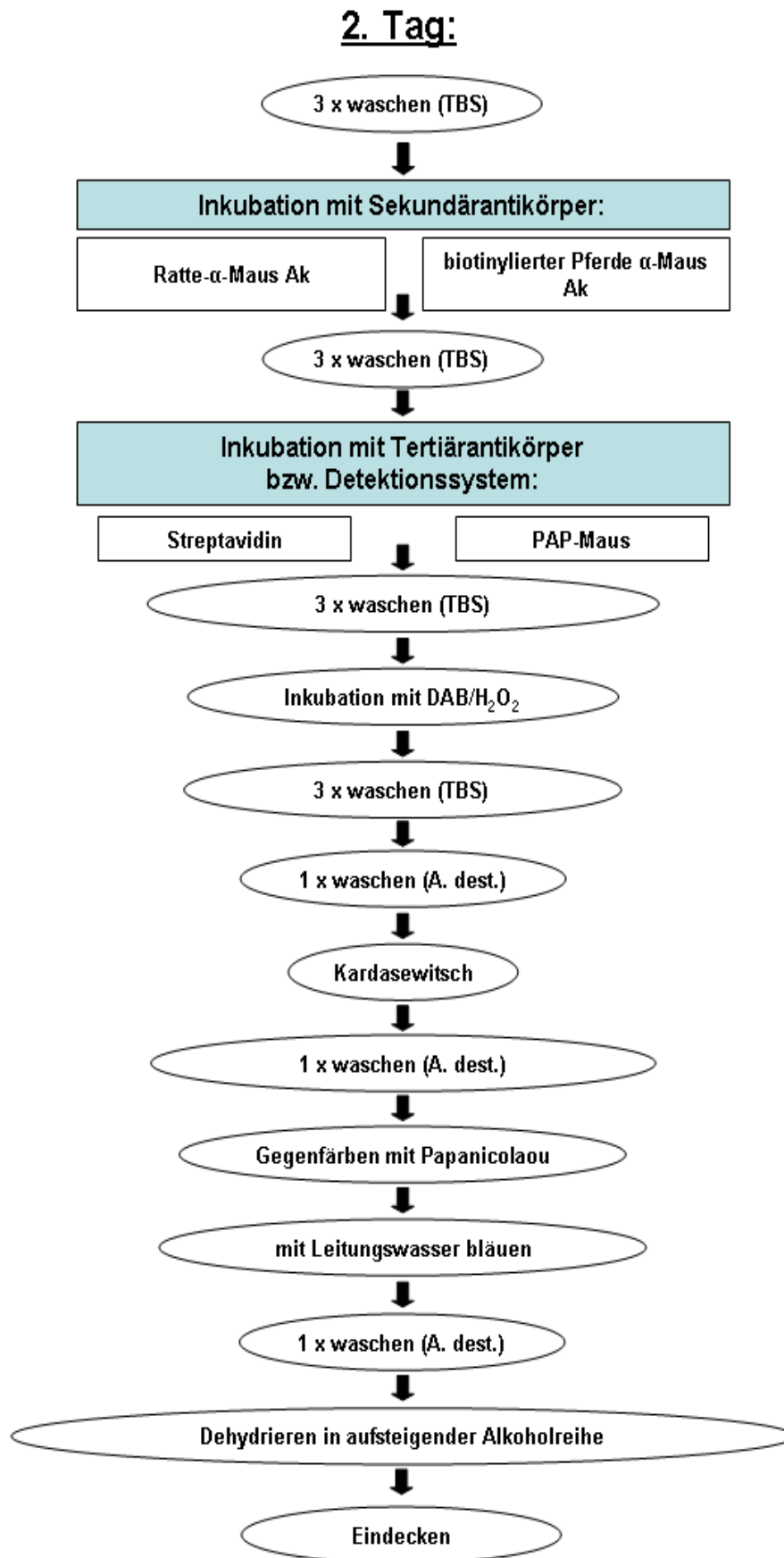


Abbildung 3.1: Methodischer Ablauf des immunhistologischen Nachweises der FCoV-Antigene

3.3.3.1 Vorbehandlungen

Die verwendeten Vorbehandlungen sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

3.3.3.1.1 DAKO[®] Target Retrieval Solution (DTRS)

Die Lösung wurde vor Gebrauch 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Der pH-Wert lag bei 6,1. Mikrowellenstandküvetten wurden mit der gebrauchsfertigen Lösung gefüllt und im Wasserbad Thermomix 1480/Frigomix 1496 (Braun) auf 97 °C erwärmt. Wenn die Lösung die Temperatur erreicht hat, wurden die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte in die Lösung eingestellt und für 30 min inkubiert. Danach wurden die Mikrowellenstandküvetten mit den Objektträgern dem Wasserbad entnommen und bei Raumtemperatur für 20 min zum Abkühlen stehen gelassen.

Daraufhin wurden die Schnitte auf die Coverplates aufgebracht und in die entsprechende Halterung eingeführt. Dort wurden die Schnitte 3 mal 5 min mit TBS gespült.

3.3.3.1.2 Linaris[®] Histosafe Enhancer (LHE)

Die Lösung wurde vor Gebrauch 1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt. Die gebrauchsfertige Enhancer-Lösung und die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden in Mikrowellenstandküvetten auf 97 °C im Wasserbad erhitzt und in der heißen Lösung 20 min inkubiert. Danach wurden die Küvetten dem Wasserbad entnommen und bei Raumtemperatur 2 min zum Abkühlen stehen gelassen.

Nachfolgend wurden die Schnitte auf die Coverplates aufgebracht und in die entsprechende Halterung eingeführt. Dort wurden sie 3 mal 5 min mit TBS gespült.

3.3.3.1.3 Target Unmasking Fluid[®] (TUF-) Behandlung

Die Lösung wurde vor Gebrauch 1:3 mit destilliertem Wasser verdünnt. Mikrowellenstandküvetten wurden mit der gebrauchsfertigen Lösung gefüllt und im Wasserbad auf 97 °C erwärmt. Wenn die Lösung die Temperatur erreicht hatte, wurden die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte in die Lösung eingestellt und für 10 min inkubiert. Danach wurden die Mikrowellenstandküvetten mit den Objektträgern dem Wasserbad entnommen und bei Raumtemperatur für 15 min zur Abkühlung stehen gelassen.

Daraufhin wurden die Objektträger auf die Coverplates aufgebracht und in die entsprechende Halterung eingeführt. Dort wurden sie 1 mal für 5 min mit TBS gespült.

3.3.3.1.4 Trypsin-Behandlung

Die Lösung von 0,25 % Trypsin und 0,02 % CaCl_2 in Aqua dest. (pH-Wert 7,6; Kapitel 10.2) wurde hergestellt und in Mikrowellenstandküvetten im Wärmeschrank auf 37 °C erwärmt. Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden in die Lösung eingebracht und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Danach wurden die Objektträger auf die Coverplates aufgebracht und in die entsprechende Halterung eingeführt. Dort wurden die Schnitte 1 mal für 5 min mit TBS gespült.

3.3.3.1.5 Zitratpuffer-Behandlung

Der pH-Wert des 10 mM Zitratpuffers (Kapitel 10.2) wurde mittels 0,1 M HCl entweder auf 4,0 oder auf 6,0 eingestellt.

Danach wurde der Puffer in Mikrowellenstandküvetten im Wasserbad auf 97 °C erwärmt. Wenn die Lösung die Temperatur erreicht hat, wurden die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte in die Lösung eingestellt und für 23 min inkubiert. Anschließend wurden die Mikrowellenstandküvetten mit den Objektträgern dem Wasserbad entnommen und bei Raumtemperatur für 15 min zur Abkühlung stehen gelassen.

Danach wurden die Objektträger auf die Coverplates aufgebracht und in die Halterung eingeführt. Dort wurden die Schnitte 1 mal für 5 min mit TBS gespült.

3.3.3.1.6 Kombination der Zitratpuffer-Behandlung mit der DAKO® Target Retrieval Solution-Behandlung als Vorbehandlung für die Inkubation mit dem Antikörpercocktail

Der pH-Wert des 10 mM Zitratpuffers wurde mittels 0,1 M HCl auf 6,0 eingestellt.

Danach wurde der Puffer in Mikrowellenstandküvetten im Wasserbad auf 97 °C erwärmt. Wenn die Lösung die Temperatur erreicht hat, wurden die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte in die Lösung eingestellt und für 23 min inkubiert.

Anschließend wurden die Mikrowellenstandküvetten mit den Objektträgern dem Wasserbad entnommen und für 5 min in 37 °C TBS gewaschen.

Darauf folgend wurden die Objektträger in Mikrowellenstandküvetten, die mit der auf 97 °C erwärmten gebrauchsfertigen Lösung DAKO® Target Retrieval Solution gefüllt waren, eingebracht und im Wasserbad bei 97 °C für 30 min inkubiert. Danach wurden die Mikrowellenstandküvetten mit den Objektträgern dem Wasserbad entnommen und bei Raumtemperatur für 20 min zur Abkühlung stehen gelassen.

Anschließend wurden die Objektträger auf die Coverplates aufgebracht und in die Halterung eingeführt. Dort wurden die Schnitte 1 mal für 5 min mit TBS gespült.

Tabelle 3.5: Methoden zur Antigen-Demaskierung

VORBEHANDLUNG	KONZENTRATION	METHODE	DAUER
DTRS (DAKO® Target Retrieval Solution); Dako Diagnostika GmbH, Hamburg	1:10 in Aqua dest.	(Lösung vorwärmen) a) 96 °C (Wasserbad) b) RT	a) 30 min b) 20 min
LHE (Linaris® Histosafe Enhancer); Linaris Wertheim - Bettingen,	1:4 in Aqua dest.	a) 96 °C (Wasserbad) b) RT	a) 17 min b) 2 min
TUF® (Target Unmasking Fluid; Dianova GmbH, Hamburg)	1:3 in Aqua dest.	(Lösung vorwärmen) a) 96 °C (Wasserbad) b) RT	a) 10 min b) 15 min
Trypsin (Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm)	0,25 % Trypsin 0,02 % CaCl ₂ in Aqua dest. (pH 7,6)	(Lösung vorwärmen) 37 °C (Wärmeschränk)	1 h
Zitratpuffer (ZP) pH 6,0/pH 4,0	10 mM	(Zitratpuffer vorwärmen) a) 97 °C (Wasserbad) b) RT	a) 23 min b) 15 min

RT: Raumtemperatur

3.3.3.2 Detektionssysteme

Die verwendeten Detektionssysteme sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

3.3.3.2.1 Peroxidase-anti-Peroxidase Methode (PAP-Methode)

Für jeden Schnitt wurden 100 µl Antikörper-Lösung verwendet.

Der Sekundärantikörper Ratte anti-Maus IgG (1:100 in TBS) wurde aufgetragen und die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit TBS für 5 min gespült.

Maus-PAP (1:500 in TBS) wurde aufgetragen und die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde mit der Technik mit Schritt 10) fortgefahren wie oben angegeben (Kapitel 3.3.3).

3.3.3.2.2 Labeled Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode)

Für jeden Schnitt wurden 100 µl Antikörper-Lösung verwendet.

Der biotinylierte Sekundärantikörper Pferd anti-Maus IgG (1:100 in TBS) wurde aufgetragen und die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit TBS für 5 min gespült.

Anschließend wurde HRP-Streptavidin (Zymed Laboratories, San Francisco, 1:1000 in TBS) aufgetragen und die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde mit der Technik mit Schritt 10) fortgefahren wie oben angegeben (siehe Kapitel 3.3.3).

3.3.4 Immunhistologischer Nachweis von myeloid/histiocyte-Antigen

Das myeloid/histiocyte Antigen (Calprotectin, leucocyte protein L1) wurde mittels der PAP-Methode mit dem Primärantikörper Maus anti-myeloid/histiocyte Antigen (MAC 387; M0747, Dako) nachgewiesen. Der Antikörper reagiert mit Monozyten, vor Kurzem aus dem Blut ausgewanderten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in entzündlichen Veränderungen. Sämtliche Inkubationen wurden, sofern nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur durchgeführt.

Durchführung:

- 1) Entparaffinieren der Schnitte in Xylol-Ersatz für 10 min. Entfernen des Xylol-Ersatzes in Alkohol (2x Isopropylalkohol, 1 x 96 % und 1x 80 % Ethanol für je 3 min)
- 2) Inaktivierung der endogenen Peroxidase in 0,5 % Wasserstoffperoxid in Methanol für 30 min
- 3) Waschen der Schnitte in TBS für 3x5 min (pH-Wert 7,6)
- 4) Protease-Behandlung: Inkubation der Objektträger für 5 min in NaCl-PBS (pH-Wert 7,2) bei 37 °C; danach erfolgte eine 5 min Protease-Behandlung mit 0,05 % bakterieller Protease Typ XXIV (Sigma) frisch verdünnt in 37 °C warmem NaCl-PBS (pH-Wert 7,2); 3x5 min spülen mit eiskaltem TBS
- 5) Aufbringen der Objektträger auf Coverplates und Einführen der Coverplates in die Halterung
- 6) Inkubation mit 10 % Rattenserum in TBS für 10 min
- 7) Auftragen des Primärantikörpers MAC 387 (1:1000) bzw. des Kontrollantikörpers T₁ in gleicher Verdünnung (Negativkontrolle); Inkubation der Schnitte für 18-20 h bei 4 °C
- 8) Spülen der Schnitte durch Einbringen von TBS in die Coverplates 3x für je 5 min
- 9) Auftragen des 1:1000 in TBS verdünnten Sekundärantikörpers Ratte anti-Maus IgG und Inkubation der Schnitte für 30 min
- 10). Spülen der Schnitte durch Einbringen von TBS in das Coverplate 3x für je 5 min
- 11) Auftragen des 1:500 in TBS verdünnten Maus-PAP und Inkubation der Schnitte für 30 min
- 12) Spülen der Schnitte 3x für je 5 min in TBS, Entnehmen der Schnitte aus den Coverplates
- 13) Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in einer Küvette in 0,05 % DAB mit 0,01 % Wasserstoffperoxid in 0,1 M Imidazolpuffer (pH-Wert 7,1) für 10 min bei Raumtemperatur
- 14) Waschen der Schnitte 3x für je 5 min in TBS und 1x5 min in Aqua dest.
- 15) Inkubation der Schnitte in Kardasewitsch-Lösung
- 16) Waschen der Schnitte in Aqua dest. für 10 min
- 17) Gegenfärben mit Papanicolaou Hämatoxylin für etwa 20 sec und Bläuen der Schnitte in lauwarmem Leitungswasser für 5 min
- 18) Waschen der Schnitte für 5 min in Aqua dest.
- 19) Entwässern der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe und dreimaliges Klären in Roti-Histol[®] für je 3 min. Anschließend überführen in Xylol

20) Eindecken mit Folie im Eindeckautomaten

Der Nachweis des MAC 387-Antigens wurde auf allen Schnitten der 24 Granulome in den 21 Nieren durchgeführt, um die morphologische Diagnose zu sichern, dass es sich bei den im Granulom involvierten Zellen v. a. um Makrophagen handelt.

3.3.5 Immunhistologischer Nachweis von Immunglobulin G

Immunglobulin G (IgG) wurde mittels der PAP-Methode mit dem Primärantikörper Kaninchen anti-Hund IgG nachgewiesen. Der Antikörper gegen canines Immunglobulin G kreuzreagiert mit dem Immunglobulin G der Katze und dient zum Nachweis von Plasmazellen.

- 1) Entparaffinieren der Schnitte in Xylol-Ersatz für 10 min. Entfernen des Xylol-Ersatzes in Alkohol (2x Isopropylalkohol, 1 x 96 % und 1x 80 % Ethanol für je 3 min)
- 2) Inaktivierung der endogenen Peroxidase in 0,5 % Wasserstoffperoxid in Methanol für 30 min
- 3) Waschen der Schnitte in TBS für 3x5 min (pH-Wert 7,6)
- 4) Protease-Behandlung: Inkubation der Objektträger für 5 min in NaCl-PBS (pH-Wert 7,2) bei 37 °C; danach erfolgte eine 5 min Protease-Behandlung mit 0,05 % Protease frisch verdünnt in 37 °C warmem NaCl-PBS (pH-Wert 7,2); 3x5 min spülen mit eiskaltem TBS
- 5) Aufbringen der Objektträger auf Coverplates und Einführen der Coverplates in die Halterung
- 6) Inkubation mit 20 % Schweineserum in TBS für 10 min
- 7) Auftragen des Primärantikörpers Kaninchen anti-Hund IgG (1:6000) bzw. des Kaninchenkontrollserums in gleicher Verdünnung (Negativkontrolle); Inkubation der Schnitte für 18-20 h bei 4 °C
- 8) Spülen der Schnitte durch Einbringen von TBS in die Coverplates 3x für je 5 min
- 9) Auftragen des 1:100 in 20 % Schweineserum in TBS verdünnten Sekundärantikörpers Schwein anti-Kaninchen IgG und Inkubation der Schnitte für 30 min
- 10). Spülen der Schnitte durch Einbringen von TBS in das Coverplate 3x für je 5 min
- 11) Auftragen des 1:100 in 20 % Schweineserum in TBS verdünnten Kaninchen-PAP und Inkubation der Schnitte für 30 min

- 12) Spülen der Schnitte 3x für je 5 min in TBS, Entnehmen der Schnitte aus den Coverplates
- 13) Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in einer Küvette in 0,05 % DAB mit 0,01 % Wasserstoffperoxid in 0,1 M Imidazolpuffer (pH-Wert 7,1) für 10 min bei Raumtemperatur
- 14) Waschen der Schnitte 3x für je 5 min in TBS und 1x5 min in Aqua dest.
- 15) Inkubation der Schnitte in Kardasewitsch-Lösung
- 16) Waschen der Schnitte in Aqua dest. für 10 min
- 17) Gegenfärben mit Papanicolaou Hämatoxylin für etwa 20 sec und Bläuen der Schnitte in lauwarmem Leitungswasser für 5 min
- 18) Waschen der Schnitte für 5 min in Aqua dest.
- 19) Entwässern der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe und dreimaliges Klären in Roti-Histol® für je 3 min. Anschließend überführen in Xylol
- 20) Eindecken mit Folie im Eindeckautomaten

3.4 Versuchsaufbau

3.4.1 Antikörperversuchsreihe

Die zu testenden Primärantikörper (Tabelle 3.2) wurden an Granulomen in Organen, die häufig bei einer FIP-Erkrankung betroffen sind, erprobt. Dabei wurden die Primärantikörper in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt und mit unterschiedlichen Vorbehandlungen und Nachweismethoden kombiniert.

Ziel dieses Versuchs war es, die optimale Verdünnung, Vorbehandlung und Methode für jeden einzelnen Antikörper zu finden.

3.4.2 Semiquantitative Bewertung und Beurteilung des Einflusses postmortalen Faktoren auf die Signalstärke

Die untersuchten Nierengranulome wurden in vier verschiedene Frischegrade und anhand des FCV3-70 als Standardantikörper in vier verschiedene Reaktionsintensitäten unterteilt (Tabelle 3.6). Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde immer dasselbe Granulom eines Tieres untersucht. Das einzelne Granulom wurde als statistische Einheit betrachtet. Zur Durchführung wurden Serienschnitte angefertigt und diese mit fünf verschiedenen monoklonalen Antikörpern immer in derselben Reihenfolge inkubiert. Außerdem wurde auch die Kombination von vier dieser Antikörper („Cocktail“) getestet. Der fünfte Antikörper (6F7) wurde nicht im Cocktail verwendet, da er (eventuell aufgrund einer Anti-Idiotyp-Antikörper-Reaktion) noch zusätzlich einzelne Plasmazellen anfärbte.

Die Inkubationen wurden aufgrund der großen Zahl an Objektträgern in 4 Läufen durchgeführt.

Mit diesem Versuchsaufbau sollten fünf Aspekte untersucht werden:

- 1) Der Einfluss des Frischegrades auf die Markierung der infizierten Zellen.
- 2) Vergleich der verschiedenen Antikörpermarkierungen mit derjenigen des Standardantikörpers.
- 3) Unterschiede zwischen den einzelnen Antikörpern in der Stärke ihrer Markierung.
- 4) Die intrazelluläre Verteilung der durch verschiedene Antikörper nachgewiesenen Strukturproteine.
- 5) Verbesserung der Markierung durch Kombination von Antikörpern, die gegen unterschiedliche Strukturproteine gerichtet sind.

Der Versuchsaufbau gestaltete sich folgendermaßen und für jeden Antikörper gleich: Für jede Reaktionsintensität und jeden Frischegrad wurden jeweils 2 Granulome mit jedem Antikörper einzeln und dem „Cocktail“ inkubiert.

3.4.3 Immunhistologischer Nachweis der FCoV-Antigene bei fraglichen FIP-Fällen

In dem untersuchten Zeitraum traten 9 Fälle auf, bei denen die pathologischen Befunde für eine FIP-Erkrankung sprachen, jedoch bei der Inkubation mit dem Standardantikörper FCV3-70 kein Virusantigen nachgewiesen werden konnte.

Diese Fälle wurden:

- nochmals mit FCV3-70, aber mit einer anderen Vorbehandlung (Zitratpuffer pH 6,0) inkubiert,
 - im selben Inkubationsdurchgang mit dem „Cocktail“ inkubiert und
 - mit den restlichen einzelnen Antikörpern des „Cocktails“ (52D5, F19-1, 1F12) inkubiert, falls das Ergebnis des „Cocktails“ dem des FCV3-70 (Vorbehandlung Zitratpuffer pH 6,0) widersprach,
- um zu eruieren, ob auf diesem Wege doch Virusantigen nachgewiesen werden kann.

3.4.4 Immunhistologische Kontrollen

Als Positivkontrolle für den Nachweis des FCoV-Antigens dienten bei der Antikörper-Versuchsreihe Gewebeschnitte (Niere, Leber, Lunge, Milz) von Routinefällen des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, die in der immunhistologischen Routinediagnostik eine positive Reaktion für das FCoV-Antigen gezeigt hatten.

Bei der semiquantitativen Bewertung wurde bei jedem der Inkubationsläufe eine Positivkontrolle mitgeführt. Auch bei dieser wurde immer dasselbe Granulom beurteilt und die RI notiert.

Als Negativkontrollen dienten die jeweils mit dem Kontrollserum inkubierten Folgeschnitte. Außerdem wurden Gewebsschnitte von Katzen, die nicht an FIP erkrankt waren (s. Tabelle 10.4), und SPF-Katzen mit den verschiedenen Primärantikörpern gegen FCoV inkubiert.

3.5 Kriterien zur Beurteilung der immunhistologischen Reaktion

3.5.1 Nachweis von FCoV-Antigen

Eine positive Reaktion zeigte sich als eine feingranuläre, braune Färbung des gesamten Zytoplasmas oder als akzentuierte, perinukleäre, braune Färbung in der Zelle.

3.5.2 Kriterien für die Beurteilung der Antikörperversuchsreihe

Hier wurden alle auf dem Objektträger vorhandenen Granulome nach folgenden Kriterien beurteilt:

- Reaktionsintensität (RI) und deren Schwankungsbreite in den verschiedenen Granulomen je eines Organs desselben Tieres (Tabelle 3.6),
- Hintergrundfärbung (Tabelle 3.7).

Außerdem sollten die Zellen trotz möglicher starker Markierung noch als zugehörig zu einer bestimmten Zellart (z. B. Makrophagen) zu identifizieren sein: So sollten die Makrophagen am reichlich vorhandenen Zytoplasma und dem exzentrischen, blassblauen Kern erkennbar sein.

Tabelle 3.6: Reaktionsintensität

REAKTIONSINTENSITÄT	
3	schon mit 2,5er-Objektiv sichtbar
2	erst mit 10er-Objektiv sichtbar
1	nur mit 40er- oder 100-Objektiv sichtbar
0	kein Signal

Tabelle 3.7: Hintergrundfärbung

HINTERGRUNDFÄRBUNG	
3	fast das gesamte Gewebe braun, positive Zellen kaum erkennbar
2	braune Hintergrundfärbung, positive Zellen aber erkennbar
1	geringgradige braune Hintergrundfärbung, positive Zellen gut erkennbar
0	keine Hintergrundfärbung

3.6 Statistische Analyse

Die Datenhaltung und -auswertung sowie die Erstellung der grafischen Abbildungen im Rahmen der Ergebnispräsentation erfolgten auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammes BMDP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon, 1993) durchgeführt. Die grafischen Abbildungen wurden auf einem Laptop mit dem Programm Excel erzeugt.

Zur Beschreibung der Variablen Reaktionsintensität (RI), Frischegrad und Hintergrundfärbung (Hgf) wurden arithmetische Mittelwerte (\bar{x}), Minima (x_{\min}) und Maxima (x_{\max}) und die Standardabweichung berechnet sowie eine Betrachtung von Differenz und relativer Differenz vorgenommen.

Zur statistischen Prüfung des Einflusses der Antikörper auf Signifikanz wurde bei den ordinalverteilten Merkmalen ein globaler Vergleich in Form einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich Antikörpern mit dem Programm BMDP2V durchgeführt. Falls sich hierbei signifikante Unterschiede nachweisen ließen, wurden die Gruppen anschließend paarweise mit dem Friedman-Test verglichen (Sachs, 2004).

Die Untersuchung der Zusammenhänge (Reaktionsintensität – Frischegrad, Reaktionsintensität – Hintergrundfärbung) erfolgte mit Hilfe von Korrelations- und Regressionsanalysen mit dem Programm BMDP6D unter Angabe des Rangkorrelations-Koeffizienten nach Spearman (r_s) und der Regressionsgeraden

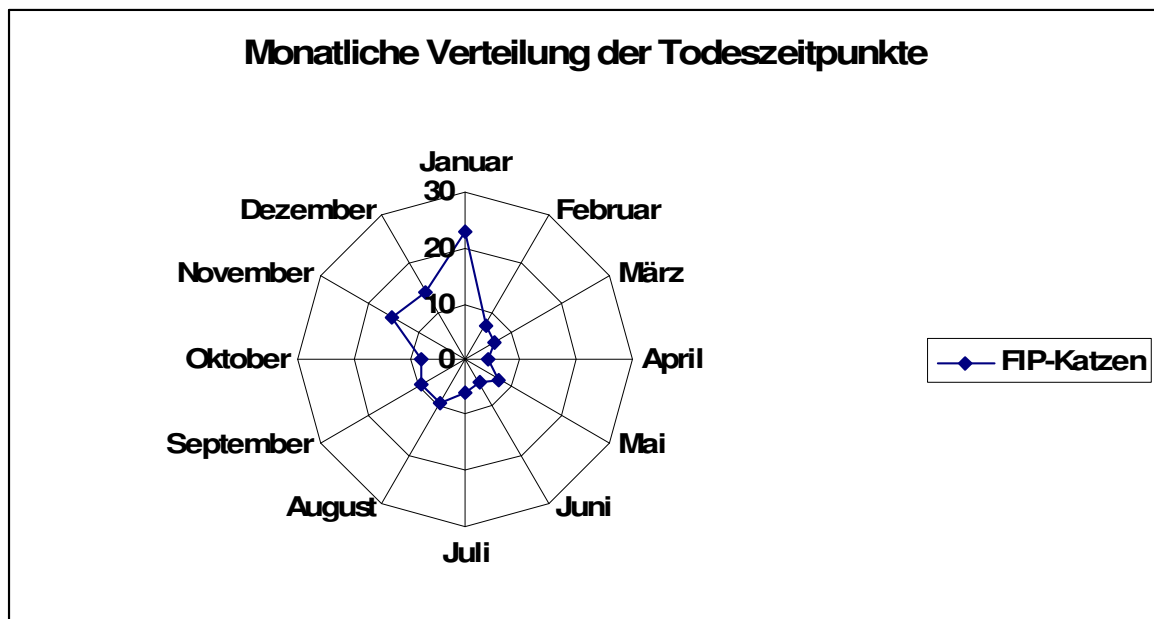
($y=m \cdot x+b$). Für die Beziehungen zwischen Reaktionsintensität und Hintergrundfärbung sowie Frischegrad und Hintergrundfärbung wurden die Zusammenhänge mit dem exakten Wilcoxon-Mann-Whitney-Test untersucht.

Bei der Bewertung statistischer Signifikanz wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, das heißt, Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Zusätzlich wird – wenn möglich – der exakte p-Wert angegeben.

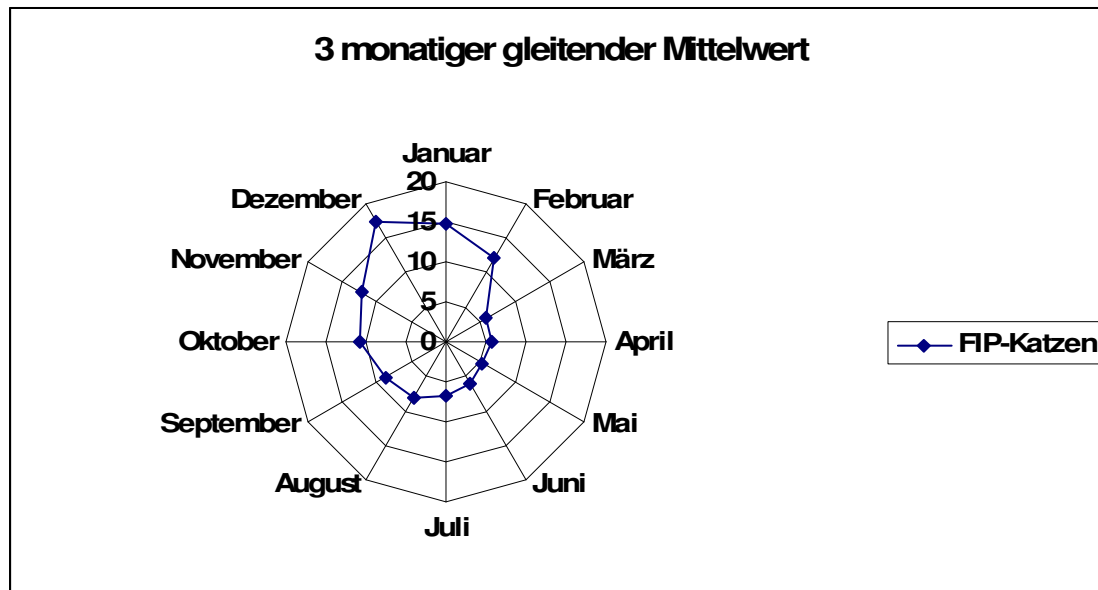
4 Ergebnisse

In der Zeit von März 2002 bis Ende Februar 2005 wurden 969 Katzen routinemäßig im Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen seziert. Bei 113 dieser Katzen wurde eine FIP immunhistologisch diagnostiziert, was einen Prozentsatz von 11,7 % des Katzensektionsgutes in diesem Zeitraum darstellt.

Knapp die Hälfte der in diesem Institut untersuchten FIP-Katzen starb in den Monaten November bis Januar (46 %) (Grafik 4.1 und 4.2). 55 % der FIP-Katzen wiesen eine exsudative (= feuchte) Form der FIP auf, die anderen 45 % eine trockene Form. Bei den 113 Katzen wies von den großen Parenchymenten die Niere (54 Katzen = 48 %) am häufigsten FIP-typische Veränderungen auf, gefolgt von Leber (44 Katzen = 39 %), Milz (40 Katzen = 35 %) und Lunge (32 Katzen = 28 %).



Grafik 4.1: Monatliche Verteilung der Todeszeitpunkte von an FIP erkrankten Katzen im Zeitraum von März 2002 bis Ende Februar 2005



Grafik 4.2: Dreimonatige gleitende Verteilung der Todeszeitpunkte von an FIP erkrankten Katzen im Zeitraum von März 2002 bis Ende Februar 2005

4.1 Ergebnisse der Antikörperversuchsreihe

4.1.1 Verdünnung, Vorbehandlung und Nachweismethode bei der Verwendung der einzelnen monoklonalen Antikörper

Bei diesem Versuch wurde ermittelt, welche Verdünnung und Vorbehandlung sich für eine optimale Bindung des jeweiligen monoklonalen Antikörpers (mAk) an das entsprechende Epitop im Antigen eignen. Zusätzlich wurde untersucht, mit welcher Methode sich der gebundene Antikörper am besten nachweisen ließ (Kapitel 3.4.1). Wichtigstes Kriterium war hierbei die „Signal-to-Noise-Ratio“ (Signal-Rausch-Verhältnis): Erwünscht war ein möglichst starkes, klares Signal mit möglichst geringer Hintergrundfärbung. Ein zweites Kriterium war, dass die stark markierten Zellen trotz ihrer dunklen Färbung einem bestimmten Zelltyp zuzuordnen sein sollten. Als weitere Kriterien dienten die Reaktionsintensität (RI) und ihre Schwankungsbreite in den verschiedenen Granulomen je eines Organs desselben Tieres (Tabelle 3.6).

4.1.1.1 Ergebnisse bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers FCV3-70

Der Standardantikörper FCV3-70 wird in der Routinediagnostik im Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig Universität Gießen nach einer Vorbehandlung mit TUF® und unter Anwendung der Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode (PAP-Methode) eingesetzt. In dieser Arbeit wurde diese Vorgehensweise modifiziert.

Die RI des mAk FCV3-70 ist mit der Labeled Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode) meist höher als mit der PAP-Methode. Bei der Verwendung der LSAB-Methode ist jedoch bei den meisten Vorbehandlungen auch eine stärkere Hintergrundfärbung zu sehen.

Daher fiel für alle weiteren Untersuchungen die Wahl auf die PAP-Methode. Die Vorbehandlung mit Zitratpuffer (pH-Wert 6,0) erbrachte hierbei aufgrund der stärksten RI, der geringen Hintergrundfärbung (hohe Signal-to-Noise-Ratio) und der geringen Markierungsschwankung das beste Ergebnis (siehe Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Reaktionsintensität und Hintergrundfärbung des monoklonalen Antikörpers FCV3-70 bei der Kombination verschiedener Vorbehandlungen mit den Nachweismethoden PAP und LSAB

VB	FIP-Granulome in	PAP		LSAB	
		RI	Hgf	RI	Hgf
ohne	Leber	0	0	0	0
	Milz	0	0	0	0
ZP pH 4,0	Leber	2-3	1	2-3	1
	Milz	1-3	1	2-3	1
ZP pH 6,0	Leber	3	0	3*	1
	Milz	2-3	0	3	1
TUF®	Leber	1-2	1	2-3	1
	Milz	0-3	1	3	1
DTRS®	Leber	2-3	2	3	1
	Milz	2-3	2	3	1
LHE®	Leber	1-2	2	3	1
	Milz	1-3	2	3	1
Trypsin	Leber	0	0	2-3	0
	Milz	0	0	0	0

DTRS: Dako® Target Retrieval Solution; Hgf: Hintergrundfärbung; LHE: Linaris® Histosafe Enhancer; RI.: Reaktionsintensität; TUF®: Target unmasking fluid; VB: Vorbehandlung; ZP: Zitratpuffer; Einstufung der Zahlen siehe Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7

*Die Zellmorphologie ließ sich als Folge von Überfärbung nicht gut erkennen.

4.1.1.2 Ergebnisse bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers 52D5

Die 52D5-Antikörper-Markierung unter der Anwendung der LSAB-Methode ergab bei fast jeder Vorbehandlung eine höhere Hintergrundfärbung als bei der Verwendung der PAP-Methode, auch wenn erstgenannte Methode meist eine stärkere RI bewirkte.

In Kombination mit der PAP-Methode erwies sich DAKO® Target Retrieval Solution (DTRS) als die Vorbehandlung der Wahl (siehe Tabelle 4.2). Bei dieser Behandlung bewährte sich die Verdünnung des monoklonalen Antikörpers 52D5 von 1:500.

Tabelle 4.2: Reaktionsintensität und Hintergrundfärbung des monoklonalen Antikörpers 52D5 bei der Kombination verschiedener Vorbehandlungen mit den Nachweismethoden PAP und LSAB

		PAP		LSAB	
VB	FIP-Granulome in	RI	Hgf	RI	Hgf
ohne	Leber	0	0	0-1	1
	Milz	0	0	0	1
ZP pH 4,0	Leber	0-2	0	1-2	1
	Milz	0-2	0	1-2	1
ZP pH 6,0	Leber	0-1	0	1-3	1
	Milz	0-1	0	2	1
TUF®	Leber	0	0	0-3	1
	Milz	0	0	0-1	1
DTRS®	Leber	2	0	3	1
	Milz	2	0	3	1
LHE®	Leber	0-1	0	3	1
	Milz	0	0	2	1
Trypsin Typ XXIV	Leber	0-1	1	0	0
	Milz	0-1	1	0	0

DTRS: Dako® Target Retrieval Solution; Hgf: Hintergrundfärbung; LHE: Linaris® Histosafe Enhancer; RI.: Reaktionsintensität; TUF®: Target unmasking fluid; VB: Vorbehandlung; ZP: Zitratpuffer; Einstufung der Zahlen siehe Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7

4.1.1.3 Ergebnisse bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers F19-1

Die Hintergrundfärbung blieb bei der LSAB- und der PAP-Methode bei dem monoklonalen Antikörper F19-1 auf niedrigem Niveau.

Die Kombination von Zitratpuffer (pH-Wert 6,0) als Vorbehandlung mit der PAP-Methode sowie die Kombination von DTRS® als Vorbehandlung mit der LSAB-Methode erzielten die stärkste RI des monoklonalen Antikörpers F19-1 (siehe Tabelle 4.3).

Sowohl bei der Zitratpuffer/PAP-Kombination als auch bei der DTRS®/LSAB-Kombination bewährte sich eine Ak-Verdünnung von 1:1000.

Tabelle 4.3: Reaktionsintensität und Hintergrundfärbung des monoklonalen Antikörpers F19-1 bei der Kombination verschiedener Vorbehandlungen mit den Nachweismethoden PAP und LSAB

VB	FIP-Granulome in	PAP		LSAB	
		RI	Hgf	RI	Hgf
ohne	Leber	0	0	0-1	0
	Milz	0	0	0-1	0
ZP pH 4,0	Leber	0-2	1	0-2	0
	Milz	1-2	1	0-3	0
ZP pH 6,0	Leber	2-3	0	2-3	1
	Milz	2-3	0	2-3	1
TUF®	Leber	0-3	1	0-2	0
	Milz	1-2	1	0-2	0
DTRS®	Leber	2	0	2-3*	0
	Milz	0-2	0	2-3*	0
LHE®	Leber	2-3	0	2-3*	0
	Milz	1-2	0	1-2*	0
Trypsin	Leber	0-2	0	0	0
	Milz	0-2	0	0	0

DTRS: Dako® Target Retrieval Solution; Hgf: Hintergrundfärbung; LHE: Linaris® Histosafe Enhancer; RI.: Reaktionsintensität; TUF®: Target unmasking fluid; VB: Vorbehandlung; ZP: Zitratpuffer; Einstufung der Zahlen siehe Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7

*= Die Zellmorphologie ließ sich als Folge der Überfärbung nicht gut erkennen.

4.1.1.4 Ergebnisse bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers 6F7

Beim Austesten der verschiedenen Methoden in Kombination mit dem monoklonalen Antikörper 6F7 wies die LSAB-Methode bei allen verwendeten Vorbehandlungen immer eine mehr oder weniger starke Hintergrundfärbung auf (Tabelle 4.4). Bei der LSAB-Methode ohne Vorbehandlung wurde der gesamte Schnitt braun gefärbt. Dies traf auch auf die Negativkontrolle zu.

Die RI des gebundenen mAk 6F7 nach Anwendung der LSAB-Methode war oft stärker als nach Anwendung der PAP-Methode.

Die Ergebnisse in der Tabelle 4.4 verdeutlichen, dass die Kombination der DTRS®-Vorbehandlung mit der PAP-Methode die höchste Signal-to-Noise-Ratio und die geringste Schwankungsbreite ergab. Dieses Verfahren wurde deshalb bei der weiteren Anwendung des mAk 6F7 eingesetzt.

Bei dieser Behandlung bewährte sich eine Ak-Verdünnung von 1:50.

Tabelle 4.4: Reaktionsintensität und Hintergrundfärbung des monoklonale Antikörpers 6F7 bei der Kombination verschiedener Vorbehandlungen mit den Nachweismethoden PAP und LSAB

		PAP		LSAB	
VB	FIP-Granulome in	RI	Hgf	RI	Hgf
ohne	Leber	0	0	0	3
	Milz	0	0	0	3
ZP pH 4,0	Leber	0-2	0	2-3*	2
	Milz	1-2	0	0-3*	1
ZP pH 6,0	Leber	1-3*	0	1-2	1
	Milz	1	0	1	1
TUF®	Leber	1-2	0	2	1
	Milz	0-2	0	1-2	1
DTRS®	Leber	3	0	2	1
	Milz	2-3	0	1-2	1
LHE®	Leber	0-1	0	2-3*	1
	Milz	0-2	0	2-3*	1
Trypsin	Leber	0-1	0	0-1	1
	Milz	0-1	0	0-1	1

DTRS: Dako® Target Retrieval Solution; Hgf: Hintergrundfärbung; LHE: Linaris® Histosafe Enhancer, RI.: Reaktionsintensität; TUF®: Target unmasking fluid; VB: Vorbehandlung; ZP: Zitratpuffer; Einstufung der Zahlen siehe Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7

*= Die Zellmorphologie ließ sich als Folge der Überfärbung nicht gut erkennen.

4.1.1.5 Ergebnisse bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers 1F12

Die Kombination von DTRS® als Vorbehandlung mit der PAP-Methode ergab die geringste Hintergrundfärbung, die stärkste RI und die geringste Schwankungsbreite (siehe Tabelle 4.5).

Bei dieser Behandlung bewährte sich eine Ak-Verdünnung von 1:2500.

Tabelle 4.5: Reaktionsintensität und Hintergrundfärbung des monoklonalen Antikörpers 1F12 bei der Kombination verschiedener Vorbehandlungen mit den Nachweismethoden PAP und LSAB

		PAP		LSAB	
VB	FIP-Granulome in	RI	Hgf	RI	Hgf
ohne	Leber	0-2	0	3	3
	Milz	0-2	0	2	2
ZP pH 4,0	Leber	3	0	1-3	2
	Milz	2-3	0	1-2	2
ZP pH 6,0	Leber	3	0	3	3
	Milz	2	0	2	2
TUF®	Leber	2-3	0	2	2
	Milz	2	0	3	3
DTRS®	Leber	3	0	3	3
	Milz	3	0	2	2
LHE®	Leber	2	0	3	3
	Milz	2	0	2	2
Trypsin	Leber	0-2	0	1-2	2
	Milz	0-1	0	0	0

DTRS: Dako® Target Retrieval Solution; Hgf: Hintergrundfärbung; LHE: Linaris® Histosafe Enhancer; RI.: Reaktionsintensität; TUF®: Target unmasking fluid; VB: Vorbehandlung; ZP: Zitratpuffer; Einstufung der Zahlen siehe Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7

4.1.1.6 Ergebnisse bei der Verwendung der Kombination ausgewählter monoklonaler Antikörper (52D5, FCV3-70, F19-1 und 1F12) als „Cocktail“

Als beste Vorbehandlung für den „Cocktail“ erwies sich eine Kombination aus Zitratpuffer mit pH-Wert 6,0 (der bei den Ak F19-1 und FCV3-70 die besten Ergebnisse erbrachte) und DTRS® (die für 52D5 und 1F12 optimal war).

Da der Nachweis der einzelnen mAk mit der PAP-Methode am besten gelang (Ausnahme: F19-1 mit der LSAB-Methode gleich gut), wurde diese Methode für den „Cocktail“ übernommen.

Nach Auswertung der Tabellen ergaben sich für den jeweiligen Ak die in Tabelle 4.6 aufgeführte, am besten geeignete Verdünnung, Vorbehandlung und Methode.

Tabelle 4.6: Primärantikörper, deren geeignete Verdünnung, zum Blocken verwandte Seren, bewährte Vorbehandlung und immunhistologische Nachweismethode

ANTIKÖRPERKLON (ZIELANTIGEN)	VERDÜNNUNG	BLOCKING SERUM	VORBE- HANDLUNG	METHODE
FCV3-70 (→ N-Protein)	1:60* 1:280*	10 % RS in TBS	ZP pH 6,0	PAP
52D5 (→ N-Protein)	1:500	10 % RS in TBS	DTRS®	PAP
F19-1 (→ M-Protein)	1:1000	10 % RS in TBS	ZP pH 6,0	PAP
6F7 (→ M-Protein)	1:50	10 % RS in TBS	DTRS®	PAP
1F12 (→ S-Protein)	1:2500	10 % RS in TBS	DTRS®	PAP
„Cocktail“ FCV3-70, F19-1, 1F12, 52D5 (→ N-, M- und S- Protein)	Endverdünnung des jeweiligen Antikörpers im Cocktail wie oben für jeden Ak angegeben	10 % RS in TBS	DTRS® + ZP pH 6,0	PAP

ZP: Zitratpuffer; RS: Rattenserum; DTRS: Dako® Target Retrieval Solution; LHE: Linaris® Histosafe Enhancer, pH: pH-Wert

* verschiedene Werte, da zwei verschiedene Chargen mit unterschiedlicher Proteinmenge verwendet wurden.

4.2 Auswertung des Nachweises der verschiedenen Strukturproteine des Felinen Coronavirus (FCoV)

Es gibt Hinweise darauf, dass verschiedene Strukturproteine des FCoV an unterschiedlichen Orten der Wirtszelle lokalisiert sind. So befindet sich das Nukleokapsidprotein im gesamten Zytoplasma, während das M-, E- und das S-Protein im Golgi-Apparat vorhanden sind (Siddell et al., 1982; Lai und Holmes, 2001). Aus diesen Daten resultierte für die vorliegende Untersuchung folgende Frage: Lassen sich die Strukturproteine Nukleokapsid(N)-, Membran(M)-, Envelope (E)- und Spikeprotein (S) in ihrer immunhistologischen intrazellulären Darstellung unterscheiden?

Das E-Protein konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, da kein Antikörper gegen dieses Strukturprotein zur Verfügung stand.

4.2.1 Immunhistologischer Nachweis des N-Proteins mit den monoklonalen Antikörpern FCV3-70 und 52D5

Die mAk FCV3-70 und 52D5 weisen beide das Nukleokapsidprotein (N-Protein) nach.

Wie in den Abbildungen 4.1. und 4.2 deutlich zu erkennen, wurde das N-Protein als eine feingranuläre braune Färbung des gesamten Zytoplasmas dargestellt. Diese Art der Markierung war bei allen getesteten Verdünnungsstufen der mAk und mit den beiden immunhistologischen Untersuchungsmethoden PAP und LSAB festzustellen.



Abbildung 4.1:
FCV3-70, PAP-Methode, Obj. 100x: Das gesamte Zytoplasma der infizierten Makrophagen ist eingefärbt.

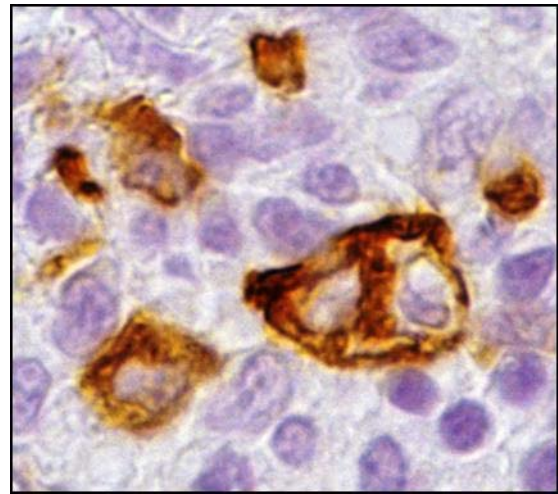


Abbildung 4.2:
52D5, PAP-Methode, Obj. 100x: Auch hier wurde das gesamte Zytoplasma der infizierten Makrophagen markiert.

4.2.2 Immunhistologischer Nachweis des M-Proteins mit den monoklonalen Antikörpern F19-1 und 6F7

Die Markierung des Membranproteins (M-Protein) zeigte sich, sowohl bei der Verwendung des mAk F19-1 (Abbildung 4.3) als auch bei der Verwendung des mAk 6F7 (Abbildung 4.4), vorwiegend als granuläres, perinukleäres Präzipitat, zu einem geringen Teil aber auch in anderen Zellen desselben Granuloms als feingranuläre braune Färbung des gesamten Zytoplasmas.

Diese Art der Markierung war sowohl beim Einsatz der PAP- als auch der LSAB-Methode bei allen getesteten Verdünnungsstufen der mAk vorzufinden.

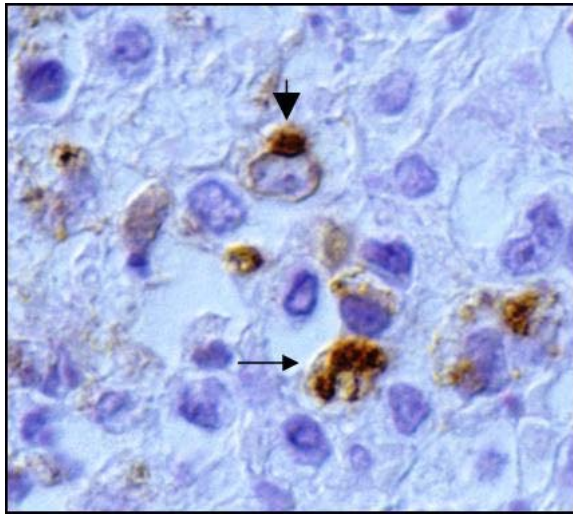


Abbildung 4.3:
F19-1, PAP-Methode, Obj. 100x: Hier zeigt sich sowohl eine perinukleär akzentuierte (kurzer Pfeil) als auch in einer anderen Zelle eine vollständige zytoplasmatische (langer Pfeil) Markierung der infizierten Makrophagen.

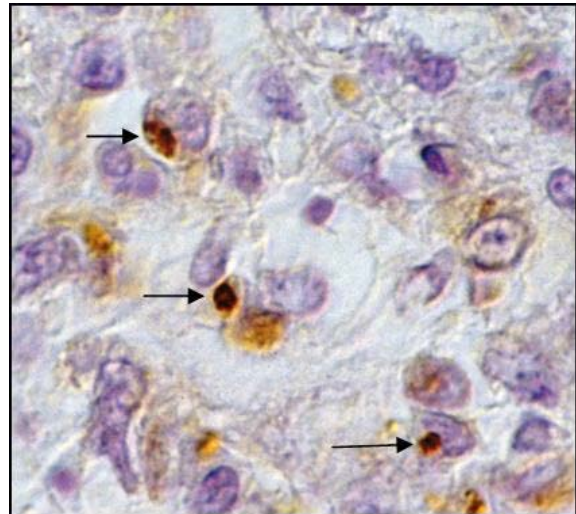


Abbildung 4.4:
6F7, PAP-Methode, Obj. 100x: Eine perinukleäre Markierung der infizierten Makrophagen (Pfeile) durch den mAk 6F7 ist festzustellen.

4.2.2.1 Markierung von Plasmazellen durch den monoklonalen Antikörper 6F7

Bei der Verwendung des mAk 6F7 (gegen das M-Protein gerichtet) wurden in Vorversuchen in Milz und in Gewebeschnitten von s261/03 und s291/03 in der Niere außer Virusantigen und den infizierten Makrophagen auch einzelne Zellen vollkommen braun eingefärbt, sodass die Zellen aufgrund der starken Markierung nicht eindeutig einem bestimmten Zelltyp zuzuordnen waren (Abbildung 4.5). Jedoch waren sie etwa 20 µm groß, oval oder rundlich, mit dunkelblauem exzentrisch liegendem Kern und reich an Zytoplasma. Diese Zellen lagen meist einzeln und waren oft außerhalb von Granulomen zu finden (Abbildung 4.5). Auch bei Schnitten von Katzen, die nicht an FIP erkrankt waren (s87/03, s1800/02, s. Tabelle 10.4), färbte der mAk 6F7 in Lymphknoten und Milz einzelne solcher Zellen an. In den Negativkontrollen, die mit dem Kontrollantikörper T₁ inkubiert wurden, wurden derartige Zellen nicht angefärbt. Eine Färbung mit Toluidinblau verlief mit negativem Ergebnis. Auch bei der Inkubation von den als Negativkontrolle verwendeten SPF-Katzen mit den unterschiedlichen Primärantikörpern einschließlich des mAk 6F7 war keine spezifische Markierung festzustellen.

Bei einer Inkubation der Schnitte mit Antiserum gegen IgG des Hundes, welches mit dem IgG der Katze kreuzreagiert, wurden die gleichen Zellen markiert wie bei der Inkubation mit dem mAk 6F7. Aufgrund dieser Markierungen wurde der mAk 6F7 nicht mit in den Cocktail aufgenommen und die positiven Zellen wurden als Plasmazellen interpretiert.



Abbildung 4.5:
6F7, PAP-Methode, Obj. 100x:
eine mit dem mAk 6F7 stark
markierte Plasmazelle in der Milz,
FIP-Katze

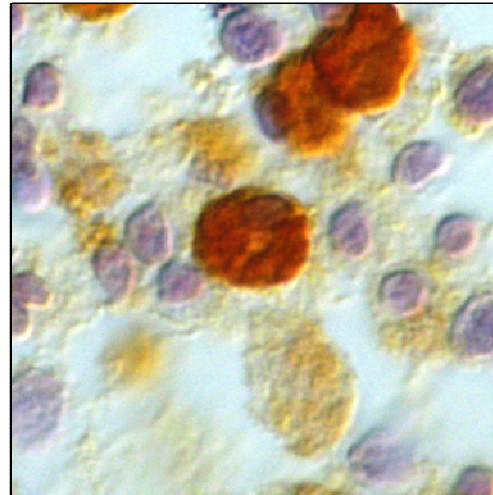


Abbildung 4.6:
Maus anti-IgG (Katze), PAP-Methode, Obj.
100x:
eine mit gegen IgG gerichteten Antikörper
markierte Plasmazelle in der Milz, FIP-Katze

4.2.3 Immunhistologischer Nachweis des S-Proteins mit dem monoklonalen Antikörper 1F12

Der mAk 1F12 stellt das Spikeprotein (S-Protein) zumeist als in der Nähe des Kernes akzentuiertes, granuläres Präzipitat dar (Abbildung 4.7). Diese Art der Markierung wurde bei allen getesteten Verdünnungsstufen, sowohl bei der Verwendung der LSAB- als auch der PAP-Methode beobachtet.

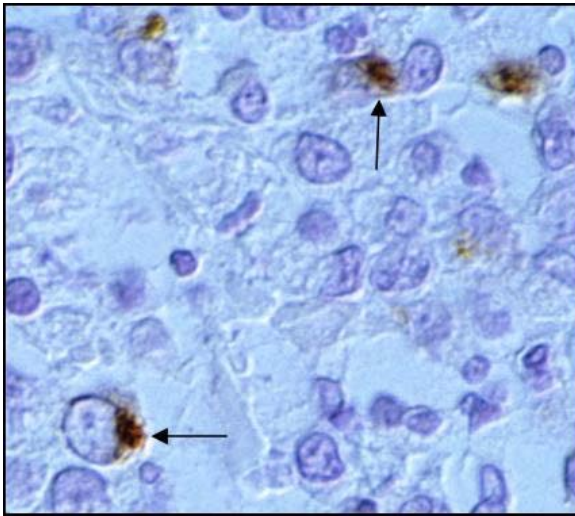


Abbildung 4.7:
1F12, PAP-Methode, Obj. 100x: Das S-Protein wird zumeist als perinukleäre Markierung (Pfeile) in den infizierten Makrophagen nachgewiesen.

4.2.4 Immunhistologischer Nachweis der Proteine N, M und S mit dem „Cocktail“

Die Kombination der mAk FCV3-70, 52D5, F19-1 und 1F12 („Cocktail“) zeigte bei Verwendung der PAP-Methode drei verschiedene Signale:

eine zytoplasmatische Verteilung (Abbildung 4.8), ein dunkleres granuläres Präzipitat in der Nähe des Kernes (Abbildung 4.9) und die Kombination beider Markierungen (zytoplasmatisch und perinukleäres Präzipitat; Abbildung 4.10).

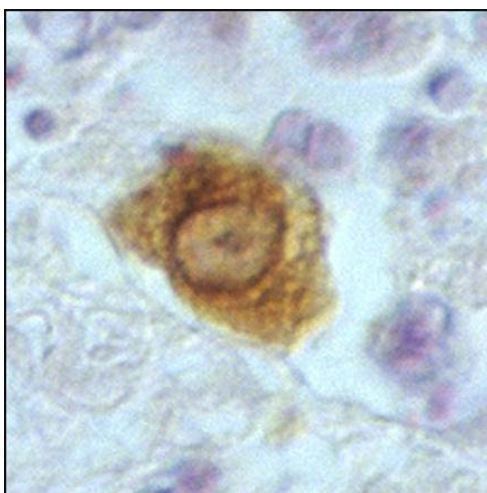


Abbildung 4.8:
„Cocktail“, PAP-Methode, Obj. 100x: Hier wurde bei der Verwendung des „Cocktails“ das gesamte Zytoplasma des infizierten Makrophagen markiert.



Abbildung 4.9:
„Cocktail“, PAP-Methode, Obj. 100x: Dieser infizierte Makrophage zeigt bei Verwendung des „Cocktails“ eine perinukleär akzentuierte Markierung.

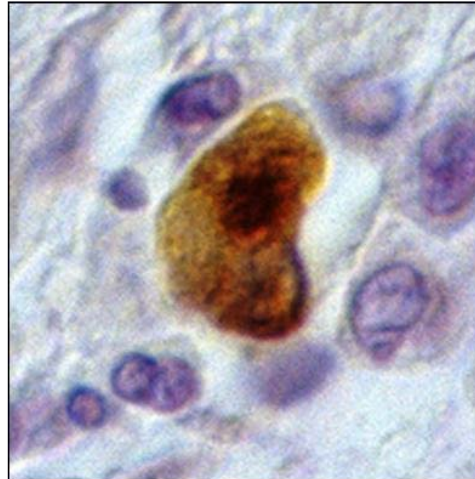


Abbildung 4.10:
„Cocktail“, PAP-Methode, Obj.
100x: Dieser infizierte Makrophage
weist bei Verwendung des
„Cocktails“ sowohl eine verstärkte
perinukleäre als auch eine
zytoplasmatische Markierung auf.

4.3 Ergebnisse der semiquantitativen Bewertung der Reaktionsintensität und der Beurteilung des Einflusses postmortaler Faktoren auf die Signalstärke

24 Granulome wurden in 4 verschiedene Frischegrade des Gewebes eingeteilt. Anhand der Markierung des mAk FCV3-70 wurden diese 24 Granulome auch in vier verschiedene Reaktionsintensitäten eingeteilt. Zum Vergleich wurden die 24 Granulome mit unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern, die verschiedene Strukturproteine nachwiesen, und deren Kombination als „Cocktail“ inkubiert.

Dieser Versuch diente dazu, den Einfluss des Frischegrades auf die beiden Variablen Reaktionsintensität (RI) und Hintergrundfärbung (Hgf.) zu prüfen (Kapitel 4.3.2).

Des Weiteren wurden alle mAk in ihrem Markierungsverhalten an den getesteten Granulomen anhand ihrer RI untereinander und mit den Ergebnissen des „Cocktails“ verglichen.

4.3.1 Kontrollen

4.3.1.1 Positivkontrolle

Zu jedem Inkubationslauf wurde ein definiertes Granulom als Positivkontrolle mitgeführt (Kapitel 3.4.4).

Die Positivkontrolle wies bei allen Inkubationen mit FCV3-70 eine RI von 2 auf (Grafik 10.1).

4.3.1.2 Negativkontrolle

Bis auf den mAk 6F7 waren weder spezifische noch unspezifische Markierungen bei den nicht an FIP erkrankten Tieren einschließlich der SPF-Katzen zu erkennen. Der mAk 6F7 markierte bei den nicht an FIP erkrankten Katzen einzelne Zellen (s. Kapitel 4.2.2.1), die als Plasmazellen angesprochen wurden.

4.3.2 Untersuchung der Korrelation der Variablen Frischegrad, Reaktionsintensität und Hintergrundfärbung

Die Korrelation der ordinalen Variablen Frischegrad, Reaktionsintensität (RI) und Hintergrundfärbung (Hgf) wurde anhand von Korrelations- und Regressionsanalysen mit dem Programm BMDP6D unter Angabe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) und der Regressionsgeraden ($y=m \cdot x+b$) untersucht.

4.3.2.1 Einfluss des Frischegrades

Bei einem der monoklonalen Antikörper (1F12), der gegen das S-Protein gerichtet ist, hatte der Frischegrad einen signifikanten Einfluss auf RI ($p<0,05$). Der Frischegrad hatte bei keinem der Antikörper einen signifikanten Einfluss auf die Hintergrundfärbung ($p>0,05$).

Es ist auffällig, dass mit Verschlechterung des Frischegrades die Zellgrenzen der markierten Zellen undeutlicher zu erkennen waren. So waren z. B. bei den

Granulomen von s634/03 und s345/05 bei den stärkeren Markierungen die Signale nicht mehr einzelnen Zellen zuzuordnen, sondern eher eine diffuse Braunfärbung des Granuloms zu beobachten, unabhängig vom verwendeten mAk (Abbildung 9.10).

4.3.2.2 Hintergrundfärbung

Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen Hintergrundfärbung und RI ($p > 0,05$) bei den verschiedenen Antikörpern.

Jedoch war festzustellen, dass die Hintergrundfärbung des „Cocktails“ zwar gering, aber in fast allen Fällen stärker als die der einzelnen monoklonalen Antikörper war (Tabelle 10.2).

4.3.3 Vergleich der untersuchten Granulome hinsichtlich der Reaktionsintensität mit den einzeln verwendeten monoklonalen Antikörpern und dem „Cocktail“

Die untersuchten Granulome wurden mit Hilfe der Markierung durch den Standardantikörper FCV3-70 in vier Reaktionsintensitäten (Tabelle 3.6) eingeteilt.

Nun stellte sich die Frage, ob diese Granulome von den anderen eingesetzten Ak 52D5, F19-1, 6F7, 1F12 und dem „Cocktail“ ähnlich stark markiert würden.

Als Negativkontrolle wurde ein gegen Thymuszellen des Huhnes gerichteter Antikörper verwendet. Hier war keine Markierung der Katzengewebe zu erkennen.

4.3.3.1 Reaktionsintensität

Die Reaktionsintensität (RI) nach Inkubation mit dem F19-1 entsprach mit Ausnahme von s343/03, s261/03, s291/03, s345/03a und s129/03 der des mAk FCV3-70. Die Markierung durch den mAk 52D5 stimmte bis auf s2378/02, s1597/03, s343/03, s327/03a, s138/05, s634/03, s129/03 und s156/05 mit den RI des mAk FCV 3-70 überein (Tabelle 10.2).

Nach Inkubation mit dem mAk 6F7 wurden die Granulome meist in dieselben RI wie mit dem mAk FCV3-70 eingeteilt mit Ausnahme von s748/04, s337/04, s293/03, s82/04, s890/04, s291/03, 480/05 und s345/05a. Die Markierung des S-Proteins mit dem mAk 1F12 wich meist von der durch den Standardantikörper FCV3-70

vorgegebenen RI ab. Auffällig ist, dass der mAk 1F12 bis auf drei Fälle (s293/03, s337/04 und s1597/03) bei allen Granulomen mit der niedrigsten RI markierte.

Die RI des „Cocktails“ der mAk stimmte nicht mit der des Standardantikörpers FCV3-70 überein. Bis auf drei Granulome (s1597/03, s343/03 und s1039/04) markierte der Cocktail gleichbleibend mit einer hohen RI.

Eine wichtige Beobachtung ist, dass alle einzeln verwendeten mAk, außer den mAk 1F12 und 52D5, unabhängig von dem jeweils nachgewiesenen Strukturprotein die Granulome s1597/03, s327/03 und s345/05 in eine RI von 1 einstufen. Der mAk 1F12 markierte s327/03 mit einer RI von 1, s1597/03 und s345/05 jedoch gar nicht. Der mAk 52D5 markierte alle oben genannten Granulome mit 1 außer s1597/03, den er gar nicht markierte.

Der „Cocktail“ markierte die genannten Granulome mit einer stärkeren Intensität (s1597/03 mit einer RI von 2, s327/03 und s345/05 mit einer RI von 3).

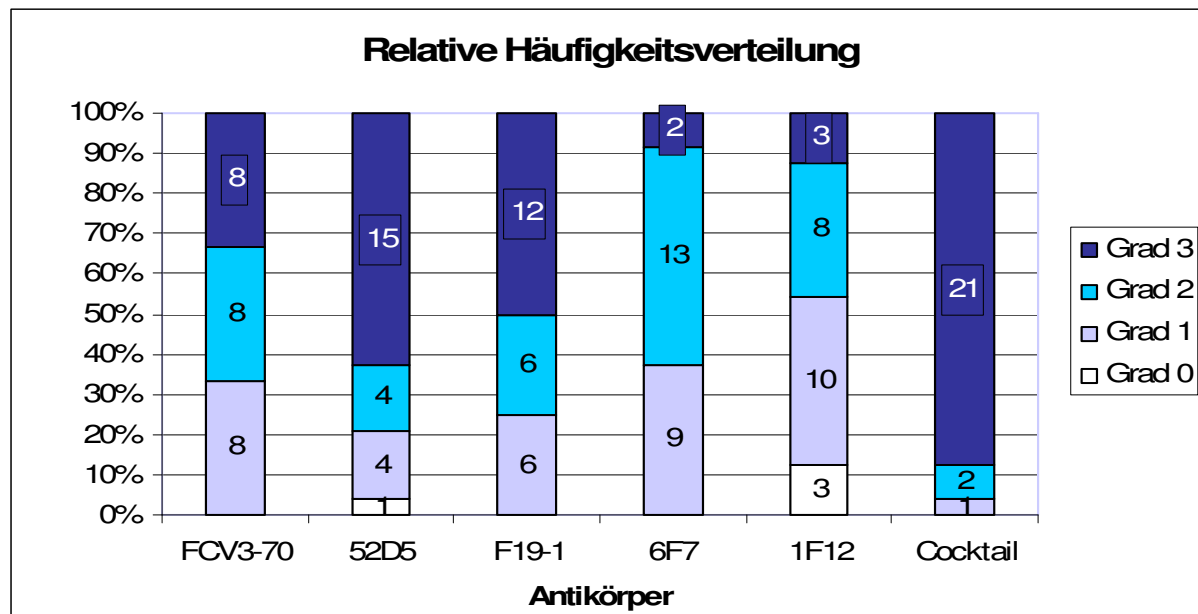
4.3.4 Vergleich der Markierungen von Virus-Strukturproteinen mit unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern

Die Stärke der Markierung der Virus-Strukturproteine wird durch die Variable „Reaktionsintensität“ (RI) beschrieben.

Auf dem globalen Vergleich nach dem Friedman-Test (Varianzanalyse) aller Antikörper basierend konnte anschließend der paarweise Vergleich durchgeführt werden. Für den Vergleich wurde die Bonforoni-Adjustierung verwendet.

Der Vergleich wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Unterschiede zwischen den einzelnen Antigen-Markierungen der unterschiedlichen mAk festzustellen.

Die folgende Grafik 4.3 und Tabelle 4.8 verdeutlichen die unterschiedliche RI der mAk.



Grafik 4.3: Darstellung der relativen Häufigkeitsverteilung der Reaktionsintensitäten der verwendeten monoklonalen Antikörper. Die Zahlen in den Skalen sind die absoluten Werte.

Tabelle 4.7: Darstellung der Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima der Reaktionsintensitäten der einzelnen mAk und des „Cocktails“

	MITTELWERT	STANDARD- ABWEICHUNG	MINIMUM	MAXIMUM
FCV 3-70	2,0	0,83	1	3
52D5	2,38	0,92	0	3
F19-1	2,25	0,85	1	3
6F7	1,71	0,62	1	3
1F12	1,46	0,88	0	3
Cocktail	2,83	0,48	1	3

Wie aus der Grafik 4.3 und den Tabelle 4.7 und 4.9 zu ersehen ist, detektierte der „Cocktail“ die FIP-Fälle am besten, gefolgt von dem N-Protein nachweisenden mAk 52D5, dem M-Protein nachweisenden mAk F19-1, dem N-Protein nachweisenden FCV3-70, dem M-Protein nachweisenden 6F7 und zuletzt dem S-Protein nachweisenden mAk 1F12.

Anhand des „Friedman-Tests“ und gefolgt von Vergleichen mit Bonforoni-Adjustierung wurde eine signifikant höhere RI des „Cocktails“ gegenüber der RI der mAk FCV3-70, 6F7 und 1F12 nachgewiesen ($p < 0,01$). Weiterhin wurde eine signifikant niedrigere RI des 1F12 (S-Protein) gegenüber der RI von F19-1, 52D5 und der des „Cocktails“ festgestellt ($p < 0,01$).

Im Vergleich der RI der beiden das M-Protein nachweisenden mAk, F19-1 und 6F7, wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt ($p > 0,05$). Die RI der beiden mAk FCV3-70 und 52D5, die das Nukleokapsid nachweisen, unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant.

Da die semiquantitative Bewertung nach der Markierung durch den Standardantikörper FCV3-70 ausgerichtet wurde, wurde das Verhältnis der Markierungen der übrigen Antikörper zu der des Standardantikörpers genauer untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Variable RI dieser mAk mit der des Standardantikörpers verglichen.

Wie Grafik 4.3 und Tabelle 4.8 zu entnehmen ist und mittels Friedman-Test abgesichert wurde, markierten der N-Protein nachweisende mAk 52D5 und der M-Protein nachweisende mAk F19-1 stärker als der das N-Protein nachweisende Standardantikörper FCV3-70, jedoch nicht auf signifikantem Niveau.

Die Markierungen des das S-Protein nachweisenden mAk 1F12 und die des M-Protein nachweisenden mAk 6F7 sind zwar im Trend schwächer, weisen aber beide keine signifikant geringere RI als der Standardantikörper auf (Tabelle 4.8).

Der S-Protein nachweisende mAk 1F12 markierte drei Granulome gar nicht, der N-Protein nachweisende mAk 52D5 ein Granulom nicht (Tabelle 10.2).

Wie es sich auch schon in den vorherigen Berechnungen ergab, zeigte die Markierung durch den „Cocktail“ eine signifikant höhere RI als die des mAk FCV3-70.

Tabelle 4.8: Signifikante Unterschiede in der Reaktionsintensität zwischen den verschiedenen Antikörpern

	6F7	FCV3-70	F 19-1	52D5	„Cocktail“
1F12	n. s.	n. s.	0,03	0,01	$p < 0,001$
6F7		n. s.	n. s.	0,09	$p < 0,001$
FCV3-70	n. s.		n. s.	n. s.	0,02
F19-1	n. s.	n. s.		n. s.	n. s.
52D5	0,09	n. s.	n. s.		n. s.

n. s. = nicht signifikant; die angegebenen Werte sind die genauen p-Werte

4.4 Immunhistologischer Nachweis der FCoV-Antigene bei fraglichen FIP-Fällen

Im Untersuchungszeitraum dieser Doktorarbeit gab es 9 Katzen, bei denen morphologische Hinweise auf eine FIP-Erkrankung existierten, die aber in der immunhistologischen Untersuchung mit dem Standardantikörper FCV3-70 negativ getestet worden waren (Tabelle 10.3). Proben aller neun Katzen wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit nachbearbeitet:

Diejenigen Organe, die FIP-typische Läsionen aufwiesen, wurden erneut mit dem Standardantikörper FCV3-70 inkubiert, diesmal jedoch mit einer anderen Vorbehandlung, die sich in den Studien dieser Arbeit als geeigneter erwiesen hatte (Zitratpuffer mit pH-Wert 6,0; Tabelle 4.1).

Fünf der neun Fälle wurden diesmal - im Widerspruch zum Ergebnis in der ersten immunhistologischen Untersuchung - vom Standardantikörper FCV3-70 markiert (Tabelle 4.9).

Im gleichen Inkubationsansatz wurden dieselben Organe der oben genannten Katzen mit dem „Cocktail“ untersucht. Hier wurden acht der neun Fälle positiv markiert. Drei davon waren auch bei der zweiten Inkubation mit dem Standardantikörper nicht markiert worden (Abbildung 9.12 und Abbildung 9.13). Diese wurden zusätzlich noch mit den anderen einzelnen Antikörpern (den mAk 52D5, F19-1 und 1F12) des „Cocktails“ inkubiert.

Zwei davon wurden von allen Antikörpern des „Cocktails“ außer dem FCV3-70 markiert, der dritte nur vom N-Protein nachweisenden mAk 52D5.

Eine Katze (s1073/03, Tabelle 4.9) war wiederholt nach Inkubation mit allen Antikörpern negativ.

Tabelle 4.9: Markierung (RI) fraglicher FIP-Fälle durch FCV3-70 mit unterschiedlichen Vorbehandlungen und durch den „Cocktail“ bzw. dessen einzelnen Antikörpern

Tgbnr.	FCV3-70 VB: TUF	FCV3-70 VB: ZP pH 6,0	„Cocktail“	52D5	1F12	F19-1
s1349/02	Netz 0	Netz 1	Netz 1			
s1565/02	Lnn 0	Lnn 0	Lnn 2	Lnn 3	Lnn 0	Lnn 0
s2395/02	Lu 0	Lu 2	Lu 2			
s672/03	Serosa 0	Serosa 0	Serosa 2	Serosa 2	Serosa 2	Serosa 1 - 2
s1073/03	Le, Lu 0	Le, Lu 0	Le, Lu 0			
s2060/03	Gehirn 0	Gehirn 2	Gehirn 2-3			
s89/04	Lnn, Le 0	Lnn 1 Le 0	Lnn 2 Le 2			
s431/04	Le 0 Ni 0 Lu 0	Le 0 Ni 0 Lu 0	Le 2-3 Ni 3 Lu 2	Le 2 Ni 2 Lu 2	Le 1 Ni 1 Lu 1	Le 2 Ni 2 Lu 2
s542/04	Gehirn 0	Gehirn 3	Gehirn 3			

Le: Leber; Lnn: Lymphknoten; Lu: Lunge; Ni: Niere, Tgbnr.: Tagebuchnummer; VB: Vorbehandlung;
Def. RI s. Tabelle 3.6

5 Diskussion

5.1 Untersuchungsmaterial

Die in dieser Arbeit untersuchten, an FIP erkrankten Katzen waren zu 70 % jünger als zwei Jahre. Diese Feststellung deckt sich mit der mehrerer anderer Studien (Addie und Jarrett, 1992; Rohrbach et al., 2001).

Die meisten Katzen starben in den Wintermonaten (November bis Januar: 46 %, s. Grafik 4.1 und 4.2). Rohrbach (2001) stellte eine Häufung der FIP-Erkrankungen vor allem in den Monaten Januar bis April fest. Möglicherweise ist die Häufung in dieser Jahreszeit auf das kalte und feuchte Wetter zurückzuführen. Kommen weitere Stressfaktoren, wie bei weiblichen Katzen der Geburtstermin oder bei Welpen der Abgabetermin an neue Besitzer, erhöht sich das Risiko für die Katzen, an FIP zu erkranken.

Das Peritoneum war im Rahmen meiner Doktorarbeit von allen Organen aufgrund der Häufigkeit der exsudativen FIP am häufigsten betroffen. Doch zeigte es in den FIP-spezifischen Veränderungen, wie auch bei Kipar (1998) beschrieben, zum einen meist nur wenige Antigen enthaltende Makrophagen, zum anderen waren die Granulome nicht groß genug, um genügend Material für die semiquantitative Bewertung zu liefern.

Die FIP-typischen Veränderungen in den Nieren wiesen dagegen zumeist, wie auch bei Kipar (1998), viele Makrophagen mit starkem Antigengehalt auf und ergaben genügend Material für die folgenden Untersuchungen. Die Nieren sind, vor allem bei der trockenen Form der FIP, die am häufigsten befallenen Organe (Montali und Strandberg, 1972; Hayashi et al., 1980; Kipar et al., 1998). Auch in meinen Untersuchungen waren die Nieren von den großen Parenchymenten am häufigsten betroffen (Kapitel 4) und boten sich daher als Organ der Wahl für die semiquantitative Bewertung an.

Aus meinen Untersuchungen ging hervor, dass die immunhistologischen Signale in ein und derselben Katze in Granulomen in verschiedenen Geweben und sogar in verschiedenen Granulomen im selben Organ an Häufigkeit und Intensität deutlich voneinander abwichen. Diese Beobachtung wurde ebenfalls von Tammer (1996) und Kipar (1998) beschrieben. Aufgrund dieses Phänomens wurde bei allen verwendeten monoklonalen Antikörpern dasselbe Granulom eines Tieres untersucht.

Auf diese Weise kam es vor, dass zwei verschiedene Granulome desselben Tieres (s327/03, s1039/04 und s345/05) untersucht wurden und dem gleichen Frischegrad zugeordnet, aber in zwei unterschiedliche Reaktionsintensitäten (RI) eingeteilt wurden. Die Anzahl der in die unterschiedlichen RI eingestuften Granulome konnte so genügend erhöht werden, um signifikante Aussagen machen zu können.

5.2 Bemerkungen zum Aufbau und zur Auswertung der Studie

5.2.1 Antikörperversuchsreihe

5.2.1.1 Auswahl geeigneter Antikörper und Vorbehandlungen

Zur Detektion von Antigenen stehen sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper (Ak) zur Verfügung.

Die meist preisgünstigeren **polyklonalen Antikörper** haben den Vorteil einer oft höheren Affinität zum Antigen bei gleichzeitiger Detektion verschiedener Epitope der Antigene und damit eine größere Reaktivität, aber den Nachteil einer geringeren Spezifität als monoklonale Antikörper (Hayat, 2002). Durch den Nachweis mehrerer Epitope des Zielproteins wird ihre Anwendung unabhängiger von der Fixierung bzw. Vorbehandlung. Wenn es durch Fixative oder durch harsche Antigendemaskierungsmethoden zur Modifikation einiger Epitope kommt und diese daraufhin die mAk nicht mehr binden, werden die übrigen, nicht veränderten Epitope immer noch erkannt.

Ein Nachteil ist, dass mit der Anzahl der verschiedenen Antikörper gegen das gleiche Antigen die Wahrscheinlichkeit von Kreuzreaktionen mit ähnlichen Epitopen auf anderen Proteinen steigt und dadurch die falsch positiven Ergebnisse zunehmen können (Mighell et al., 1998). Außerdem ist bei der Anwendung von polyklonalen Antiseren ein höherer Grad an unspezifischen Bindungen und damit eine erhöhte Hintergrundfärbung zu erwarten.

Monoklonale Antikörper (mAk) sind Antikörper, die von einer auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgehenden Zelllinie (Zellklon) produziert werden, und die sich gegen ein einzelnes Epitop richten. Sie binden spezifischer als polyklonale Antikörper. Die Hintergrundfärbung aufgrund von anderen Immunglobulinen ist

reduziert, wenn Aszites verwandt wird, oder praktisch nicht existent, wenn Zellkulturüberstand eingesetzt wird (Rader, 2001).

Eine Möglichkeit, die Vorteile der polyklonalen und der monoklonalen Antikörper zu vereinen, ist die Mischung verschiedener monoklonaler Antikörper („Cocktail“). Dies verspricht ein starkes spezifisches Signal und eine geringe unspezifische Hintergrundfärbung (Luttmann et al., 2004).

Um diesen Denkansatz zu testen, wurden in vorliegender Arbeit monoklonale Antikörper einzeln und miteinander kombiniert verwendet.

Wie in der Literaturübersicht unter Kapitel 2.5.1 beschrieben, muss die Vorbehandlung der Histologieschnitte immer auf den jeweils verwendeten Antikörper abgestimmt werden, auch wenn es Vorbehandlungen gibt, die mit den meisten Antikörpern ein zufriedenstellendes Ergebnis erbringen. So wird Zitratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 allgemein als adäquate Vorbehandlung für viele Antikörper angesehen (Ramos-Vara, 2005). Dies traf auch auf zwei Antikörper bei den eigenen Untersuchungen in Kombination mit der PAP-Methode zu (FCV3-70 und F19-1); siehe Tabelle 4.6.

Bei den übrigen Antikörpern (1F12, 52D5 und 6F7) erzielte eine kommerziell erhältliche „Antigen Retrieval“-Lösung (DAKO® Target Retrieval Solution) mit der PAP-Methode ein besseres Ergebnis.

Wie wichtig die optimale Vorbehandlung ist, ist aus Abbildung 9.1 und Abbildung 9.2 ersichtlich. Während in dem Präparat, das mit TUF® vorbehandelt wurde, das Signal kaum zu sehen ist, ist es in dem Präparat, das mit Zitratpuffer pH-Wert 6,0 behandelt wurde, schon in der Lupenvergrößerung (Obj. 2,5x) zu erkennen. Weiterhin konnten bei den fraglichen FIP-Fällen drei weitere Fälle durch den Wechsel von der Vorbehandlung TUF zum Zitrat (pH-Wert 6,0) durch den mAk FCV3-70 detektiert werden (Tabelle 4.9).

Die Ursachen dafür, dass verschiedene Vorbehandlungen mit dem einen Antikörper ein besseres Ergebnis und mit einem anderen Ak ein schlechteres erbringen, sind noch nicht geklärt (Pileri et al., 1997; Shi et al., 1997).

5.2.1.2 Material und Untersuchungsmethoden

Um in der immunhistologischen Diagnostik eine möglichst sichere Aussage treffen zu können, müssen alle Komponenten (wie z. B. Antikörper, Vorbehandlungen, Methoden) optimal aufeinander abgestimmt sein, damit ein möglichst starkes Signal durch die Antigen-Antikörperbindung und eine möglichst geringe Hintergrundfärbung erzielt werden.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, für den jeweils verwendeten mAk bzw. für das entsprechende Epitop im Antigen diejenige Verdünnung, Vorbehandlung und Methode zu finden, mit denen eine eindeutige und starke Markierung bei geringer Hintergrundfärbung erbracht wurde.

Für die **Antikörperversuchsreihe** wurden deshalb Granulome ausgewählt, die durch die Markierung unter Verwendung der Routine-Vorbehandlung (TUF[®]) mit dem Standardantikörper FCV3-70 in eine mittleren Reaktionsintensität eingestuft worden waren.

Für die Verwendung von Leber und Milz von an FIP erkrankten Tieren als Untersuchungsmaterial sprachen mehrere Gründe:

Zum einen waren diese Organe sowohl bei meinen Studien als auch bei denen von Hayashi (1980), Kipar (2005) und anderen Autoren (Montali und Strandberg, 1972; Hayashi et al., 1980; Weiss und Scott, 1981b; Kipar et al., 2005) häufig bei einer FIP-Erkrankung betroffen. Zum anderen besitzt die Milz eine große Menge an Erythrozyten und damit an Pseudoperoxidase, die Leber viel natürlich vorkommendes Biotin. Sowohl die Leber als auch die Milz stellen dadurch eine besondere Herausforderung sowohl für die Anwendung der LSAB-Methode als auch für die PAP-Methode wegen der zu erwartenden verstärkten Hintergrundfärbung dar. Bei der LSAB-Methode ist die erhöhte Hintergrundfärbung auch an das untersuchte Organ gekoppelt: In der Leber ist ein größerer Gehalt an endogenem Biotin vorhanden (Bussolati et al., 1997), das hochaffin mit Streptavidin reagiert. Dieses endogene Biotin kann zwar mit einer Avidin-Biotin-Behandlung geblockt werden. Dies ist jedoch arbeits- und kostenaufwendig und führt auch nicht immer zum gewünschten Erfolg (Bussolati et al., 1997). Da die Leber aber ein häufig von FIP-spezifischen Veränderungen betroffenes Organ darstellt, muss die Wahl der Methode an die zu untersuchenden Organe (hier an die Leber) angepasst werden. Die endogene Pseudoperoxidase der Erythrozyten, vermehrt in der Milz

vorkommend, reagiert mit dem Chromogen und führt so zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung. Dadurch stellt die endogene Peroxidase sowohl für die LSAB- als auch für die PAP-Methode eine Erschwernis dar, da beide die Peroxidase als Substrat verwenden. Die so verursachte Hintergrundfärbung wird aber bei beiden Methoden meist gut durch Inkubation der Schnitte mit Methanol und Wasserstoffperoxid verhindert.

Ein wichtiges Ziel in der Immunhistologie ist eine möglichst geringe Hintergrundfärbung, um eine gute „Signal-Noise-Ratio“ (Signal-Rausch-Verhältnis) zu erzielen. Für unspezifische Hintergrundfärbungen gibt es sehr verschiedene Ursachen, die in der Literaturübersicht Kapitel 2.5.2 dargestellt wurden.

Problematisch ist, dass sich Sensitivität und Hintergrundfärbung häufig direkt proportional verhalten (Luttmann et al., 2004), d. h., bei starker Sensitivität ist die Hintergrundfärbung oft ebenfalls hoch und umgekehrt.

Wie von Cartun und Pedersen (1989) beschrieben, gewährte die LSAB-Methode bei den meisten Antikörpern auch in den Untersuchungen dieser Arbeit (FCV3-70, 52D5 und 6F7) eine höhere RI. Jedoch war hier auch die unspezifische Hintergrundfärbung stärker. Dadurch kann es zu zwei verschiedenen Fehlinterpretationen kommen:

- a) Eine unspezifische Hintergrundfärbung wird fälschlicherweise als ein spezifisches Antikörpersignal und damit als positives Ergebnis gewertet.
- b) Ein (schwaches) spezifisches Signal wird von einer flächigen Hintergrundfärbung überdeckt und fälschlicherweise als negatives Ergebnis gewertet.

Bei der PAP-Methode dagegen ergab sich meist eine etwas weniger hohe RI, dafür aber kaum Hintergrundfärbung (Kapitel 4.1.1). In den von mir durchgeführten Untersuchungen wurde viel Wert auf ein starkes spezifisches Signal bei gleichzeitig geringer Hintergrundfärbung gelegt. Dabei wurden Abstriche in der Sensitivität hingenommen, aber dafür die Sicherheit gewonnen, dass das sichtbare Signal das gesuchte Antigen markierte und keine Hintergrundfärbung darstellte.

Bei der LSAB-Methode können die verwendeten biotinylierten Sekundärantikörper noch zusätzlich die Hintergrundfärbung erhöhen. Häufig sind in den Seren der Sekundärantikörper zusätzlich Antikörper enthalten, die nicht das gesuchte Antigen nachweisen, sondern unspezifisch durch elektrostatische Wechselwirkungen an Gewebe binden. Diese „unspezifischen“ Antikörper erhöhen die Hintergrundfärbung. Bei der PAP-Methode sind die Sekundärantikörper unmarkiert und erbringen von sich aus kein Signal. Durch diese „Nichtmarkierung“ wird von vornherein ein

bestimmter Grad an Hintergrundfärbung unterdrückt, was mit einem markierten Sekundärantikörper wie bei der LSAB-Methode nicht möglich ist (Sternberger, 1979). Aus diesen Gründen wurde der PAP-Technik gegenüber der LSAB-Technik der Vorzug gegeben.

5.2.1.3 Reaktionsintensität (RI)

Die RI wurde nach ihrer Sichtbarkeit in den unterschiedlich starken Vergrößerungen festgesetzt (Tabelle 3.6). Zusätzlich wurde die Schwankungsbreite der RI in den verschiedenen Granulomen eines Schnittes berücksichtigt (Kapitel 3.5.2). Letzteres war eine gute Möglichkeit, zunächst rein qualitativ abzuschätzen, wie stark die Markierungen der jeweiligen monoklonalen Antikörper übereinstimmen.

Makrophagen stellen das Hauptziel der Virusreplikation dar (Jacobse-Geels und Horzinek, 1983; Olsen, 1993; Kipar et al., 1998; Berg et al., 2005). Deshalb wurde bei den Auswertungen in dieser Arbeit darauf geachtet, dass die vom Antikörper markierten Zellen trotz möglicher starker Färbung noch als eine bestimmte Zellart (z. B. Makrophagen) zu identifizieren waren, um sie von eventuell nur vermeintlich spezifisch markierten Zellen (z. B. Mastzellen/Plasmazellen) leichter unterscheiden zu können bzw. einen zusätzlichen, die Spezifität des Signals sichernden oder in Frage stellenden morphologischen Hinweis zu haben.

Der mAk 6F7 wurde, wie im Kapitel 4.2.2.1 bereits erwähnt, nicht im Cocktail verwendet, da er zusätzlich zu Coronavirusantigen einzelne Plasmazellen markierte. Diese Anfärbung einzelner Plasmazellen durch den mAk 6F7 ist möglicherweise auf eine Anti-Idiotyp-Ak Reaktion zurückzuführen. Idiotypen (griech. idios = eigen) sind Epitope der V-Region der Antikörper, die auf einen oder einige wenige Ak-Typen beschränkt sind – sie sind individual-spezifisch. Anti-Idiotyp-Antikörper, die gegen die Antigen-Bindungsstelle gerichtet sind, können wie ein Abbild des Originalepitops vom Antigen aussehen (Klein, 1991). Somit kann der Anti-Idiotyp-Antikörper selbst Ligand für andere Ak sein. Solche Anti-Idiotyp-Ak werden im Organismus immer wieder in geringem Maß produziert. Im Falle des mAk 6F7 kann es sein, dass er bei einzelnen Katzen in manchen Plasmazellen Anti-Idiotyp-Ak gebunden hatte, die dem Epitop ähnelten, gegen das er gerichtet war.

Viele Katzen besitzen einen Antikörper-Titer gegen FCoV, ohne an FIP zu erkranken. Dies erklärt, warum der mAk 6F7 auch bei Katzen, die nicht an einer FIP erkrankt waren, derartige Plasmazellen nachwies. Wie erwartet, war bei der Inkubation von

Gewebsschnitten von SPF-Katzen mit dem mAk 6F7 keine Markierung von Plasmazellen sichtbar.

5.3 Intrazelluläre Verteilung der verschiedenen Strukturproteine

Verschiedene Autoren zeigten, dass bei der Virusproduktion die Membranglykoproteine (M-Proteine) und die Spikeglykoproteine (S-Proteine) im Golgi-Apparat lagern, während die Nukleokapsidproteine (N-Proteine) im gesamten Zytoplasma akkumulieren (Siddell et al., 1982; Klumperman et al., 1994; Lai und Holmes, 2001).

In dieser Arbeit wurden die M- und S-Proteine meist als punktförmiges, granuläres, braunes Präzipitat nahe dem Zellkern im Bereich des Golgi-Apparates (Abbildungen 4.3 bis 4.5) und die N-Proteine als diffuse braune Markierung des gesamten Zytoplasmas (Abbildungen 4.1 und 4.2) nachgewiesen. Dieses Ergebnis unterstützt die oben genannten Ergebnisse.

Wurm et al. (2001) wiesen mit Immunfluoreszenz das N-Protein beim MHV und TGEV und Hiscox et al. (2001) beim IBV zusätzlich im Nukleolus nach. In der hier vorliegenden Arbeit konnte keine Markierung des N-Proteins des FCoV im Nukleolus beobachtet werden.

Die Tatsache, dass sowohl das M- als auch das S-Protein nachweisende Antikörper hin und wieder das gesamte Zytoplasma färbten (Abbildung 4.3), hängt möglicherweise mit dem Transport der fertigen Viruspartikel oder nur aus S-M-bestehenden Viruspartikeln in den Vakuolen zur Zytoplasmamembran zusammen.

Die Signale der im „Cocktail“ gebundenen Antikörper variierten von einem zytoplasmatischen (Abbildung 4.8) über ein perinukleäres Signal (Abbildung 4.9) bis hin zu einer Kombination beider Signale (Abbildung 4. 10).

Daraus kann geschlossen werden, dass das zytoplasmatische Signal überwiegend auf die N-Protein nachweisenden Antikörper und das perinukleär akzentuierte Signal auf die S- und M-Protein nachweisenden Antikörper des „Cocktails“ zurückzuführen sind. Bei der Kombination der Signale waren folglich alle Antigene (oder mindestens zwei davon) in einer Zelle nachgewiesen worden.

Da es aber alle drei Möglichkeiten des Signals bei der Verwendung des „Cocktails“ gab, ist davon auszugehen, dass nicht alle Antigene des Virus in allen Zellen zur selben Zeit in gleicher Menge vorhanden bzw. nachzuweisen waren.

Simkins et al. (1989) infizierten eine „swine testicle“ Zell-Linie mit TGE-Virus. Dann inkubierten sie diese Zelllinie mit Antikörpern, die gegen die verschiedenen Virus-Strukturproteine gerichtet waren. Das Nukleokapsid konnte als erstes produziertes Antigen 4 Stunden nach der Infektion der Zelllinie nachgewiesen werden. M- und S-Proteinepitope waren erst 8 Stunden nach der Inokulation nachzuweisen. Sidell et al. (1982) kamen auf ähnliche Ergebnisse mit IBV- und MHV-Viren in Zellkultur. Sie gaben auch an, dass mittels „chase period after pulse labelling“ im fortgeschrittenen Stadium der Infektion kaum noch ein Export von neu synthetisiertem N-Protein beobachtet werden konnte.

In meinen Untersuchungen wurden in Schnitten, die mit dem „Cocktail“ inkubiert worden waren, Zellen beobachtet, die nur eine perinukleäre Markierung zeigten, was bedeutet, dass nur M- und/oder S-Proteine nachzuweisen waren.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die N-Proteine in den derartig markierten Zellen schon relativ früh beim Zusammenbau (assembly) des Viruspartikels eingebaut und eventuell nicht mehr in gleicher Menge nachsynthetisiert werden. Diese Erklärung würde die These von Sidell et al. (1982) unterstützen.

5.4 Einflüsse auf das immunhistologische Ergebnis

5.4.1 Postmortale Veränderungen

Zahlreiche Arbeiten haben gezeigt, dass weder der Verwesungszustand noch die Lagerung im Paraffinblock die Nachweisbarkeit einer Reihe von Antigenen signifikant beeinflussen.

Reinacher und Theilen (1987) kamen zu dem Schluss, dass unterschiedliche Zersetzungsstadien der Tiere keinen Einfluss auf das Ergebnis der Immunhistologie beim Nachweis des Felines Leukämievirus (FeLV) haben.

Entsprechende Erfahrungen machte Wittmer (1993) in ihrer Dissertation mit FeLV, Pelstring et al. (1991) mit verschiedenen Lymphoid- (Leu-1 (CD5), Leu-2a (CD8), Leu-3a+b (CD4), Leu-4 (CD3) und Leu-14 (CD22)), Epithelial- (kappa, lambda, anti-epithelial keratin (AE-1 and AE-3)), und Mesenchymalmarkern (CLA (CD45), UCHL-1

(CD45RO), L-26, Vimentin). Auch Seelig et al. (1975), mit Basalmembranantigenen von Nieren, Wintzer et al. (1988) mit Oberflächenantigenen von Lymphozyten, Pallesen und Knudsen (1985; 1986) mit Leukozytenantigenen und Janssen et al. (1994) beim Nachweis von Androgenrezeptoren kamen zu dem gleichen Ergebnis. Im Gegensatz dazu wiesen Vis et al. (2000) bei den Antigenen p27kip1, CD-44s, MIB-1 und Androgenrezeptoren in Prostatagewebsschnitten nach, dass bei in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem, aber auf geschnittenen und auf Objektträger gezogenem und asserviertem Gewebe die Intensität des Signals exponentiell und signifikant mit der Zeit abnimmt. Den Verlust der Immunreaktion assoziierten sie mit der Beschaffenheit des jeweiligen Antigens, der Affinität des Antikörpers und dem Gewebetyp.

Die Ergebnisse der mAk F19-1, 52D5, 6F7 und des „Cocktails“ in der RI unterstützen die Beobachtung von Reinacher (1987), Wittmer (1993) und Pelstring (1991), dass der Frischegrad oft keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse der Immunhistologie hat ($p > 0,05$, Kapitel 4.3.2.1). Dies zieht die Schlussfolgerung nach sich, dass die hier nachgewiesenen Epitope relativ resistent sind gegenüber den proteolytischen Enzymen der Fäulnisbakterien und autolytischen Zellen.

Dagegen scheint das Epitop vom S-Protein nachweisenden mAk relativ sensitiv gegen diese Prozesse zu sein, da bei ihm eine signifikante Korrelation zwischen Frischegrad und RI festzustellen war ($p = 0,03$, Kapitel 4.3.2.1).

Auffällig war, dass mit einer Abnahme des Frischegrades die Zellgrenzen der markierten Zellen und damit die zelluläre Begrenzung der positiven Reaktion undeutlicher zu erkennen waren. Ursache hierfür ist voraussichtlich die Zersetzung der Zytoplasmamembranen durch Autolyse und Fäulnis (Abbildung 9.10).

5.4.2 Proteinmenge

Die nachzuweisende **Proteinmenge (Antigengehalt)** ist der limitierende Faktor: So wurden die Granulome, die durch den Standardantikörper FCV3-70 mit einer RI von 1 (=schwach) markiert wurden, auch von den übrigen monoklonalen Antikörpern meist nur schwach markiert. Dies weist auf einen allgemein geringen Antigengehalt in den jeweiligen Granulomen hin (Tabelle 10.2, Kapitel 4.3.3).

Siddell et al. (1982) stellten fest, dass ein großer intrazellulärer Pool des **N-Proteins** während der Infektion aufgebaut wird. Simkins et al. (1989) zeigten, dass das N-

Protein des FCoV in einer hohen Quantität in den infizierten Zellen produziert wird. Das **M-Protein** dagegen ist die am meisten vorhandene Proteinkomponente der Hülle (de Haan et al., 2000), nach Sturman et al. (1980) sogar die am reichlichsten vorhandene Komponente des CoV. Aufgrund ihrer hohen Proteinmenge ist es gut nachzuvollziehen, dass der das N-Protein nachweisende mAk 52D5 und der das M-Protein nachweisende mAk F19-1 ähnlich starke Markierungen erbrachten. Auch dass sich ihre RI-Werte von dem des „Cocktails“ nicht signifikant unterschieden, spricht dafür, dass N- und M-Proteine in den meisten infizierten Zellen schon früh produziert und in größeren Mengen vorhanden waren (Tabelle 4.8), (Siddell et al., 1982).

Die durchweg starke Markierung durch den „**Cocktail**“ ist vor allem auf die höhere Gesamtmenge an nachgewiesenen Virusproteinen (N-, M- und S-Protein) zurückzuführen. So wurden acht von neun fraglichen FIP-Katzen durch den „Cocktail“ sicher als FIP-Erkrankungen identifiziert (Tabelle 4.9).

Dieses Ergebnis könnte die Hypothese von Siddell (1982) und Simkins (1989) untermauern, dass eine zeitliche Abfolge in der Produktion der Strukturproteine innerhalb der Zellen vorliegt. Die im „Cocktail“ kombinierten Antikörper markierten drei von vier Strukturproteinen des FCoV. Deshalb war die RI des „Cocktails“ meistens bei Grad 3, unabhängig davon, welches Strukturprotein gerade überwiegend produziert wurde. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass beim Einsatz des „Cocktails“ bei allen bis auf eines der Granulome eine gleiche oder stärkere RI beobachtet worden ist als bei den einzeln eingesetzten mAk (Tabelle 10.2).

Es ist davon auszugehen, dass eine Reaktionsintensitätsschwelle existiert, die für alle Primärantikörper gilt. Der „Cocktail“ könnte durch Addition der Signale ermöglichen, Virusproteine auch zu detektieren, wenn diese im Einzelnachweis unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Diese Hypothese erklärt, warum der „Cocktail“ die Granulome von drei Katzen in Grad 3 einstufte, während alle einzeln verwendeten mAk diese Fälle in Grad 1 oder 0 einstufen (Tabelle 10.2).

In einem Fall (s343/03) wies die Markierung des „Cocktails“ eine geringere RI als jeder einzelne mAk auf. Möglicherweise ist dies auf verschiedene Schnittebenen innerhalb des jeweiligen Granuloms zurückzuführen.

5.4.3 Empfindlichkeit, Avidität, Variabilität

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass außer der Proteinmenge noch andere Faktoren eine Rolle spielen.

Wenn man nur von der Proteinmenge als wichtigstes Argument für eine gute RI ausgeht, fällt auf, dass der das M-Protein nachweisende mAk 6F7 und der das N-Protein nachweisende mAk FCV3-70 die Granulome zwar mit einer stärkeren RI markierten als der das S-Protein nachweisende mAk 1F12, jedoch auch meist mit einer etwas schlechteren RI als die anderen beiden N- und M-Protein nachweisenden mAk (Tabelle 4.7, Grafik 4.3).

Schon bei der Fixierung des Gewebes kommt es darauf an, wie hoch die **Empfindlichkeit** der nachzuweisenden Epitope gegenüber der Quervernetzung durch das Formalin und deren Aufbrechung durch die jeweilige Vorbehandlung ist, sodass sie von ihren Antikörpern auch nach der Prozedur noch erkannt werden können (Pileri et al., 1997; Shi et al., 1997; Werner et al., 2000; Shi et al., 2001). Auch der pH-Wert des verwendeten Puffers entscheidet darüber, ob eine durchgeführte Immunhistologie erfolgreich ist oder nicht (Shi et al., 1995; Montero, 2003; Ramos-Vara, 2005). So zeigten manche Antigene (L26, PCNA, NSE) bei den Autoren im gesamten verwendeten pH-Bereich (1-10) eine gute Demaskierung der Antigene, andere (MIB 1, ER) in sehr geringem, mittleren bis hohen Bereich, und die dritte Gruppe zeigte mit steigendem pH eine stärkere Intensität, jedoch im niedrigen pH-Bereich eine sehr geringe Intensität (MT1, HMB45) (Shi et al., 1995). Dies konnte auch bei den eigenen Ergebnissen nachvollzogen werden (Tabelle 4.9, Kapitel 4.4).

Eine nicht zu unterschätzende Rolle spielt die **Avidität**, die die gesamte Bindungsstärke zwischen Antikörper und Antigen bezeichnet. Eine der wichtigsten Komponenten der Avidität ist die Affinität: Die Affinität definiert die monovalente Bindungsstärke zwischen Epitop und Paratop, die über die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante gemessen wird (Linke, 1998).

Möglicherweise sind die von den mAk FCV3-70 und 6F7 nachgewiesenen Epitope sensibler gegenüber den von mir durchgeführten Behandlungen (Kapitel 3.3.3.1) als die von den mAk F19-1 und 52D5 markierten Epitope. Auch wäre es möglich, dass die Affinitäten zwischen den hier verwendeten mAk und ihren Epitopen unterschiedlich stark waren und so auch zu den unterschiedlichen Ergebnissen beigetragen haben.

Horzinek et al. (1986) legten bei der Untersuchung der Spezifität der Immunkomplexe und der Antikörper-Spezifität von mit FCoV-Virus infizierten Katzen dar, dass die geringste Immunantwort gegen das S-Protein gerichtet war. Dieses Ergebnis führten sie auf die geringe Antigenität des S-Proteins und seiner bevorzugten Induktion von Ak mit geringer Affinität zurück. Boyle (1984) und Simkins (1989) vertraten die gleiche Hypothese. Möglicherweise wies auch der in dieser Studie verwendete mAk 1F12 eine geringe Affinität zu seinem Zielantigen auf, was ebenfalls die schwache Markierung erklären würde (Abbildung 9.6, Tabelle 4.8).

Spaan et al. (1988) zeigten, dass beim **S-Protein** eine große Heterogenität in Form großer Unterschiede in der Anzahl der Aminosäuren in unterschiedlichen Coronaviren (IBV, MHV, FIPV, TGEV) und in den einzelnen Isolaten eines bestimmten Virus (MHV) vorlagen.

Aufgrund dieser Variabilität des S-Proteins wäre es möglich, dass der hier verwendete mAk 1F12 ein Epitop nachgewiesen hat, das bei sehr vielen Coronavirusstämmen nicht in dieser Form vorlag. Diese Argumente würden unter anderem erklären, warum der das S-Protein nachweisende mAk 1F12 schlechter die Granulome markierte als die anderen mAk (Grafik 4.3, Tabelle 4.7)

5.4.4 Hintergrund

Es zeigte sich, dass die mit dem „Cocktail“ inkubierten Schnitte häufiger als die mit den einzelnen mAk inkubierten Schnitte eine geringfügige diffuse bräunliche Hintergrundfärbung aufwiesen (Tabelle 10.2).

Drei der im „Cocktail“ verwendeten Antikörper (1F12, 52D5 und 6F7) stammen aus einem Aszites (Fiscus et al., 1987a, 1987b; Fiscus und Teramoto, 1987). Antikörper, die aus einem Aszites stammen, sind meist nicht vollkommen frei von unspezifischen Immunglobulinen (Rohrbach et al., 2001; Ramos-Vara, 2005). Die Seren, die aus dem Aszites einer Maus stammen, enthalten einen geringen Anteil an Maus-IgG, die nicht gegen das anvisierte Antigen gerichtet sind, aber aufgrund ihrer Tierartspezifität von einem gegen Maus-IgG gerichteten Sekundärantikörper auch nachgewiesen werden. Bei Primärantikörpern, die aus einem Kulturüberstand stammen, bestehen die Verunreinigungen aus Rinder-IgG, die später von den Sekundärantikörpern, die gegen Maus-IgG gerichtet sind, nicht nachgewiesen werden. Üblicherweise fallen die „unspezifischen Maus-IgG“ der aus einem Aszites stammenden Primärantikörpern

nicht ins Gewicht (Luttmann et al., 2004; Ramos-Vara, 2005). Doch scheint es, dass bei der Kombination mehrerer, zum Teil aus einem Aszites stammenden monoklonalen Antikörper sich nicht nur die positiven Eigenschaften summieren, sondern auch die unerwünschte Hintergrundreaktion. Dies könnte sich in einer allgemeinen Erhöhung der Hintergrundfärbung bei Verwendung des „Cocktails“ ausgewirkt haben.

5.5 Einsatz der untersuchten monoklonalen Antikörper in der Diagnostik

Als bestes „Diagnostikwerkzeug“ erwies sich die Kombination der mAk in einem „Cocktail“, da dieser die Vorteile monoklonaler Antikörper und polyklonaler Antikörper in sich vereint. Einzig der „Cocktail“ markierte signifikant stärker als der Standardantikörper FCV3-70 (Tabelle 4.8).

Falls die im „Cocktail“ verwendeten mAk nicht alle zur Verfügung stehen, kann auf einen monoklonalen Antikörper zurückgegriffen werden, der das N-Protein oder das M-Protein markiert. Diese monoklonalen Antikörper markierten am zuverlässigsten und zeigten die stärkste RI.

Ein Nachteil bei der Verwendung von das M- oder das S-Protein nachweisenden mAk liegt in der Art ihrer Markierung. So ist ihr punktuelles Signal schwerer und eventuell erst in einer höheren Vergrößerung zu erkennen als ein das gesamte Zytoplasma anfärbendes Signal, wie es bei den N-Protein nachweisenden mAk der Fall ist.

Bei den fraglichen FIP-Fällen, markierte der das N-Protein nachweisende mAk 52D5 diejenigen Granulome, die auch der „Cocktail“ erkannte, während FCV3-70 von drei dieser Katzen die Granulome nicht markierte. Die möglichen Ursachen wurden diskutiert. Zwei dieser Katzen wurden auch von den mAk F19-1 (M-Protein nachweisend) und 1F12 (S-Protein nachweisend) als FIP-positiv markiert. Damit wurde das N-Protein einmal häufiger nachgewiesen als die übrigen Virus-Strukturproteine.

Einer der fraglichen FIP-Fälle (Tgbnr. s1073/03) blieb bei allen Untersuchungen negativ (Tabelle 4.9).

Ursache hierfür könnte sein, dass die Katze tatsächlich an einer anderen Erkrankung als FIP gestorben war. Bedacht werden muss, dass objektiv nur der

immunhistologische positive Nachweis einer FIP-Erkrankung beweisend ist. Man geht davon aus, dass Granulome älter werden und mit der Zeit die FIP-infizierten Makrophagen weniger werden und die Plasmazellen zunehmen. Ein negatives Ergebnis kann darauf zurückzuführen sein. So wurde in der Literatur berichtet, dass in einigen Fällen histologisch FIP-Läsionen vorgefunden wurden, aber immunhistologisch kein FCoV-Antigen nachzuweisen war (Kipar, 2002; Euler, 2005). Trotz des einen in dieser Arbeit ungeklärten Sektionsfalls konnten bei acht Fällen mit veränderter Nachweismethode nachträglich eine FIP-Erkrankung diagnostiziert werden. Die Veränderungen lagen in der Modifikation der Vorbehandlung beim Nachweis mit dem mAk FCoV3-70, beim Einsatz des N-Protein nachweisenden mAk 52D5 sowie beim Einsatz des „Cocktails“.

Daraus lässt sich schließen, dass bei einem histologischen Verdacht auf eine FIP-Erkrankung - wenn der Standardantikörper trotz verbesserter Vorbehandlung keine Markierung zeigt - noch weitere Antikörper eingesetzt werden sollten: Entweder der das N-Protein nachweisende mAk 52D5, der das M-Protein nachweisende mAk F19-1 oder der „Cocktail“.

Nachtrag:

Nach Abfassung dieser Dissertationsschrift erschien eine Publikation (Poncelet et al., 2008) die einen monoklonalen Antikörper (CCV2-2) diagnostisch nutzt, um antigenetische Heterogenität des FIPV im Gehirn von Katzen zu belegen. Dieser Antikörper war ursprünglich auch in unserem Labor getestet worden. Er ging nicht in die vorgelegte Untersuchung ein, da er in unseren Händen nicht nur Coronavirusantigen sondern auch einzeln liegende Zellen in einer Reihe von Geweben von SPF-Katzen und sogar von anderen Spezies erkannte.

6 Zusammenfassung

1. Ziel dieser Arbeit war es, die immunhistologische Diagnostik der Felines Infektiösen Peritonitis (FIP) zu optimieren. Hierfür wurden Antikörper eingesetzt, die gegen Epitope der Nukleokapsid-, Membran- und Spikeproteine des Felines Coronavirus (FCoV) gerichtet waren.
2. In der Literaturübersicht werden Coronaviren im Allgemeinen und FCoV im Speziellen vorgestellt. Es wird der gegenwärtige Kenntnisstand in Bezug auf die virale Replikation der Coronaviren sowie auf Epizootiologie und Pathogenese der FIP dargelegt.
3. Zunächst wurden eigene immunhistologische Untersuchungen mit fünf monoklonalen Antikörpern (FCV3-70, 52D5, F19-1, 6F7 und 1F12) an Gewebsschnitten von FIPV-positiv getesteten Organen durchgeführt. Hierbei wurden die für die jeweiligen Antikörper besten Vorbehandlungen und Nachweismethoden ermittelt. Wichtige Kriterien für die Beurteilung waren die Reaktionsintensität der monoklonalen Antikörper und eine möglichst geringe Hintergrundfärbung, das heißt eine gute „Signal-Noise-Ratio“.
4. Für die getesteten monoklonalen Antikörper erfüllte die PAP-Methode am besten die in Punkt 3 erwähnten Anforderungen.
5. Spike(S)- und Membran(M)-Protein des FCoV wurden in Makrophagen als dunkelbraunes Präzipitat vor allem im perinukleären Gebiet nachgewiesen. Das Nukleokapsidprotein (N-Protein) stellte sich dagegen als feingranuläre braune Färbung im gesamten Zytoplasma dar. Diese Beobachtungen unterstützen die Vorstellung, dass die M- und S-Strukturproteine im Golgi-Apparat vorhanden sind, während das N-Protein im gesamten Zytoplasma akkumuliert.
6. Die Untersuchung der an FIP erkrankten Katzen des Sektionsgutes im Rahmen dieser Doktorarbeit ergab, dass von den großen Parenchymen die Nieren am häufigsten Granulome aufwiesen.
7. Die immunhistologische Markierung von Granulomen in den Nieren von 21 an FIP erkrankten Katzen wurde unter Verwendung des Standardantikörpers FCV3-70 in 4 verschiedene Reaktionsintensitätsstufen eingeteilt. Als Negativkontrolle fungierten Organe von 10 Katzen, die an einem Trauma oder sonstigen anderen Krankheiten als der FIP verstorben waren, und 2 SPF(specific pathogen free)-Katzen, die aus einem FeLV(Felines Leukämievirus)-Versuch stammten.

8. Der Frischegrad der untersuchten Tiere hatte außer für den Spike-Protein nachweisenden mAk 1F12 keinen signifikanten Einfluss auf den immunhistologischen Nachweis von Virusproteinen.
9. Die Ergebnisse der Markierung durch den Standardantikörper FCV3-70 wurden mit denen der einzeln verwendeten übrigen vier monoklonalen Antikörper und mit denen des „Cocktails“ (Kombination von FCV3-70, 52D5, F19-1 und 1F12) verglichen, die gegen verschiedene Strukturproteine des Feline Coronavirus gerichtet waren. Die monoklonalen Antikörper wurden untereinander anhand der Reaktionsintensität verglichen.
10. Die Reaktionsintensität der einzeln verwendeten Antikörper, die das N- bzw. das M-Protein nachwies, war am höchsten (FCV3-70, 52D5 und F19-1). Die Verwendung des gegen das S-Protein gerichteten monoklonalen Antikörpers 1F12 erscheint aufgrund der geringen Reaktionsintensität als alleiniges Diagnostikum nicht sinnvoll.
11. Die Kombination von vier der fünf monoklonalen Antikörper in einem „Cocktail“ erbrachte die höchste Sensitivität und Spezifität.
12. Mit der entsprechenden Vorbehandlung (Zitratpuffer pH-Wert 6,0) eignet sich der Standardantikörper FCV3-70 als einzeln eingesetzter monoklonaler Antikörper für die Diagnostik.

7 Summary

1. The purpose of this study was to optimize the immunohistochemical diagnosis of Feline Infectious Peritonitis (FIP). Monoclonal antibodies specific for epitopes in nucleocapsid(N)-, membrane(M)-, and the spike(S)-proteins of the Feline Coronavirus (FCoV) were applied.
2. Coronaviruses in general and feline coronaviruses in particular are discussed in the literature review. Additionally, the current knowledge about viral replication of coronaviruses as well as epizootiology and pathogenesis of FIP are discussed.
3. The optimal conditions for the immunohistochemical diagnosis of FIP using five different monoclonal antibodies (FCV3-70, 52D5, F19-1, 6F7, 1F12) were established using sections of different tissues from FIP-positive cats as positive control material. Reaction intensity and low non-specific background staining (i.e. a good signal-to-noise-ratio) were the key discriminating criteria on which judgement of the quality of immunostaining was based.
4. The Peroxidase-anti-peroxidase (PAP)-method yielded the optimal staining of sections for the monoclonal antibodies tested.
5. The spike(S)- and membrane(M)-protein-specific immunostaining were typically observed as a circumscribed precipitate near the nucleus of the macrophage whereas the nucleocapsid(N)-protein-specific immunostaining was granular and distributed throughout the entire cytoplasm. These results support the hypothesis that M- and S-proteins accumulate in the Golgi apparatus – whereas the nucleocapsid assembles throughout the cytoplasm, resulting in a more diffuse intracytoplasmic positive signal.
6. Histological review of the tissue sections from the FIP-diseased cats in this study showed that, of the parenchymatous organs, the kidneys were the site of the most severe lesions.
7. Kidney sections from 21 FIP-diseased cats were graded as to the degree of postmortal deterioration and as to the immunohistochemical reaction intensity using antibody FCV3-70 as the primary antibody. Tissue sections of ten cats, whose cause of death was other than FIP and two SPF(specific pathogen free) cats served as negative controls.

8. The degree of postmortal deterioration had except for the S-Protein detecting mAb 1F12 no significant influence on the immunohistological detection of viral epitopes.
9. The intensity of immunostaining of the FCV3-70 antibody was compared to that of the other four monoclonal antibodies individually and to a “cocktail” of four monoclonals.
10. The monoclonal antibodies specific for the M- and N-proteins (52D5, F19-1 and FCV3-70) used individually gave the best results. Use of the anti-S protein monoclonal antibody 1F12 alone for the immunohistochemical diagnosis of FIP is not recommended because of the low reaction intensity observed.
11. Combining four antibodies (FCV3-70, F19-1, 6F7, 1F12) as a “cocktail” yields the best results as to sensitivity and specificity.
12. With adequate pre-treatment of tissue sections (citrate buffer pH-value 6.0) the use of the standard antibody FCV3-70 (anti-FCoV N-protein) is suitable for diagnostic purposes.

8 Literaturverzeichnis

- Addie, D.D., Jarrett, O., 1992. A study of naturally occurring feline coronavirus infections in kittens. *Vet Rec* 130, 133-137.
- Addie, D.D., Jarrett, O., 2001. Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Vet Rec* 148, 649-653.
- Addie, D.D., Toth, S., Murray, G.D., Jarrett, O., 1995. Risk of feline infectious peritonitis in cats naturally infected with feline coronavirus. *Am J Vet Res* 56, 429-434.
- Addie, D.D., Toth, S., Herrewegh, A.A., Jarrett, O., 1996. Feline coronavirus in the intestinal contents of cats with feline infectious peritonitis. *Vet Rec* 139, 522-523.
- Baker, J.R., 1985. Principles of biological microtechnique: A study of fixation and dying. Metheun & Co, pp.
- Battifora, H., 1999. Quality assurance issues in immunohistochemistry. *J Histotech*, 169-175.
- Battifora, H., Kopinski, M., 1986. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. *J Histochem Cytochem* 34, 1095-1100.
- Benetka, V., Kubber-Heiss, A., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Hofmann-Parisot, M., Mostl, K., 2004. Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 99, 31-42.
- Berg, A.L., Ekman, K., Belak, S., Berg, M., 2005. Cellular composition and interferon-gamma expression of the local inflammatory response in feline infectious peritonitis (FIP). *Vet Microbiol* 111, 15-23.
- Boon, M.E., Kok, L.P., 1989. Mikrowellenkochbuch der Pathologie. Die Kunst der mikroskopischen Darstellung. Coulomb Press, pp.

- Boyle, J.F., Pedersen, N.C., Evermann, J.F., McKeirnan, A.J., Ott, R.L., Black, J.W., 1984. Plaque assay, polypeptide composition and immunochemistry of feline infectious peritonitis virus and feline enteric coronavirus isolates. *Adv Exp Med Biol* 173, 133-147.
- Bussolati, G., Gugliotta, P., Volante, M., Pace, M., Papotti, M., 1997. Retrieved endogenous biotin: a novel marker and a potential pitfall in diagnostic immunohistochemistry. *Histopathology* 31, 400-407.
- Büttner, A., 2004. Vergleichende Untersuchung über Translation und Transkription von Strukturproteinen des Felinen Leukämievirus nach experimenteller Infektion. Diss. Vet. med. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- Can-Sahna, K., Soydal Ataseven, V., Pinar, D., Oguzoglu, T.C., 2007. The detection of feline coronaviruses in blood samples from cats by mRNA RT-PCR. *J Feline Med Surg* 9, 369-372.
- Cartun, R.W., Pedersen, C.A., 1989. An immunocytochemical technique offering increased sensitivity and lowered cost with a streptavidin-horseradish peroxidase conjugate. *J Histotech* 12, 273-277.
- Cattoretti, G., Pileri, S., Parravicini, C., Becker, M.H., Poggi, S., Bifulco, C., Key, G., D'Amato, L., Sabattini, E., Feudale, E., et al., 1993. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 171, 83-98.
- Chen, H., Wurm, T., Britton, P., Brooks, G., Hiscox, J.A., 2002. Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cell. *J Virol* 76, 5233-5250.
- de Groot-Mijnes, J.D., van Dun, J.M., van der Most, R.G., de Groot, R.J., 2005. Natural history of a recurrent feline coronavirus infection and the role of cellular immunity in survival and disease. *J Virol* 79, 1036-1044.
- de Haan, C.A., Vennema, H., Rottier, P.J., 2000. Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins. *J Virol* 74, 4967-4978.
- Dean, G.A., Olivry, T., Stanton, C., Pedersen, N.C., 2003. In vivo cytokine response to experimental feline infectious peritonitis virus infection. *Vet Microbiol* 97, 1-12.

- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L.K., Sjostrom, H., Noren, O., Laude, H., 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 357, 417-420.
- Dixon, W.J., 1993. BMDP Statistical Software Manual, Vol 1 and 2. University of California Press, 726 pp.
- Euler, T., 2005. Vorkommen und Verteilung spezifischer Veränderungen in den Lymphknoten von Katzen mit natürlicher feline infektiöser Peritonitis (FIP). Diss. Vet. med. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- Fischer, F., Stegen, C.F., Masters, P.S., Samsonoff, W.A., 1998. Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus assembly. *J Virol* 72, 7885-7894.
- Fiscus, S.A., Teramoto, Y.A., 1987. Antigenic comparison of feline coronavirus isolates: evidence for markedly different peplomer glycoproteins. *J Virol* 61, 2607-2613.
- Fiscus, S.A., Rivoire, B.L., Teramoto, Y.A., 1987a. Epitope-specific antibody responses to virulent and avirulent feline infectious peritonitis virus isolates. *J Clin Microbiol* 25, 1529-1534.
- Fiscus, S.A., Rivoire, B.L., Teramoto, Y.A., 1987b. Humoral immune response of cats to virulent and avirulent feline infectious peritonitis virus isolates. *Adv Exp Med Biol* 218, 559-568.
- Foley, J.E., Poland, A., Carlson, J., Pedersen, N.C., 1997a. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *J Am Vet Med Assoc* 210, 1313-1318.
- Foley, J.E., Poland, A., Carlson, J., Pedersen, N.C., 1997b. Patterns of feline coronavirus infection and fecal shedding from cats in multiple-cat environments. *J Am Vet Med Assoc* 210, 1307-1312.
- Fraenkel-Conrat, H., Brandon, B.A., Olcott, H.S., 1947. The reaction of formaldehyde with proteins. IV. Participation of indole groups. *J Biol Chem* 168, 99-104.

- Godeke, G.J., de Haan, C.A., Rossen, J.W., Vennema, H., Rottier, P.J., 2000. Assembly of spikes into coronavirus particles is mediated by the carboxy-terminal domain of the spike protein. *J Virol* 74, 1566-1571.
- Gonzalez, J.M., Gomez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A.E., Enjuanes, L., 2003. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Arch Virol* 148, 2207-2235.
- Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J., Spaan, W.J., 2004. Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus. *J Virol* 78, 7863-7866.
- Griffiths, G., Rottier, P., 1992. Cell biology of viruses that assemble along the biosynthetic pathway. *Semin Cell Biol* 3, 367-381.
- Gunn-Moore, D.A., Gruffydd-Jones, T.J., Harbour, D.A., 1998. Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 62, 193-205.
- Gunn-Moore, D.A., Gunn-Moore, F.J., Gruffydd-Jones, T.J., Harbour, D.A., 1999. Detection of FCoV quasispecies using denaturing gradient gel electrophoresis. *Vet Microbiol* 69, 127-130.
- Haagmans, B.L., Egberink, H.F., Horzinek, M.C., 1996. Apoptosis and T-cell depletion during feline infectious peritonitis. *J Virol* 70, 8977-8983.
- Hardy, W.D., Jr., Hurvitz, A.I., 1971. Feline infectious peritonitis: experimental studies. *J Am Vet Med Assoc* 158, Suppl 2:994-1002.
- Hayashi, T., Ishida, T., Fujiwara, K., 1982. Glomerulonephritis associated with feline infectious peritonitis. *Nippon Juigaku Zasshi* 44, 909-916.
- Hayashi, T., Goto, N., Takahashi, R., Fujiwara, K., 1977. Systemic vascular lesions in feline infectious peritonitis. *Nippon Juigaku Zasshi* 39, 365-377.
- Hayashi, T., Utsumi, F., Takahashi, R., Fujiwara, K., 1980. Pathology of non-effusive type feline infectious peritonitis and experimental transmission. *Nippon Juigaku Zasshi* 42, 197-210.

- Hayat, M.A., 2002. Antigens and antibodies, In: Hayat, M.A. Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods for Light and Electron Microscopy. Kluwer Academic, New York, pp. 31-51.
- Hegyi, A., Kolb, A.F., 1998. Characterization of determinants involved in the feline infectious peritonitis virus receptor function of feline aminopeptidase N. *J Gen Virol* 79, 1387-1391.
- Herrewegh, A.A., Vennema, H., Horzinek, M.C., Rottier, P.J., de Groot, R.J., 1995a. The molecular genetics of feline coronaviruses: comparative sequence analysis of the ORF7a/7b transcription unit of different biotypes. *Virology* 212, 622-631.
- Herrewegh, A.A., de Groot, R.J., Cepica, A., Egberink, H.F., Horzinek, M.C., Rottier, P.J., 1995b. Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 33, 684-689.
- Herrewegh, A.A., Mahler, M., Hedrich, H.J., Haagmans, B.L., Egberink, H.F., Horzinek, M.C., Rottier, P.J., de Groot, R.J., 1997. Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Virology* 234, 349-363.
- Hirschberger, J., 1987. Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen T-Lymphozyten des Huhnes. Diss. Vet. Med. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Hiscox, J.A., Wurm, T., Wilson, L., Britton, P., Cavanagh, D., Brooks, G., 2001. The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus. *J Virol* 75, 506-512.
- Hohdatsu, T., Sasamoto, T., Okada, S., Koyama, H., 1991. Antigenic analysis of feline coronaviruses with monoclonal antibodies (MAbs): preparation of MAbs which discriminate between FIPV strain 79-1146 and FECV strain 79-1683. *Vet Microbiol* 28, 13-24.
- Hök, K., 1993a. Morbidity, mortality and coronavirus antigen in previously coronavirus free kittens placed in two catteries with feline infectious peritonitis. *Acta Vet Scand* 34, 203-210.

- Hök, K., 1993b. Development of clinical signs and occurrence of feline corona virus antigen in naturally infected barrier reared cats and their offspring. *Acta Vet Scand* 34, 345-356.
- Holmes, K.V., 2001. Coronaviruses, In: Knipe, D.M., Howley, P. M. et al. *Fields Virology*. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, pp. 1187-1185.
- Holznagel, E., 1993. Antikörper-Nachweis zur Diagnose einer Infektion mit dem Virus der Feline Immunschwäche (FIV) bei Setkionskatzen. Diss. Vet. med. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Holzworth, J., 1963. Some important disorders of cats. *Cornell Vet* 53, 157-160.
- Horzinek, M.C., Ederveen, J., Egberink, H., Jacobse-Geels, H.E., Niewold, T., Prins, J., 1986. Virion polypeptide specificity of immune complexes and antibodies in cats inoculated with feline infectious peritonitis virus. *Am J Vet Res* 47, 754-761.
- Hoshino, Y., Scott, F.W., 1980. Immunofluorescent and electron microscopic studies of feline small intestinal organ cultures infected with feline infectious peritonitis virus. *Am J Vet Res* 41, 672-681.
- Huang, S., N., Minassian, H., More, J.D., 1976. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Lab Invest* 35, 383-391.
- Imam, S.A., Young, L., Chaiwun, B., Taylor, C.R., 1995. Comparison of two microwave based antigen-retrieval solutions in unmasking epitopes in formalin-fixed tissue for immunostaining. *Anticancer Res* 15, 1153-1158.
- Jacobse-Geels, H.E., Horzinek, M.C., 1983. Expression of feline infectious peritonitis coronavirus antigens on the surface of feline macrophage-like cells. *J Gen Virol* 64, 1859-1866.
- Jacobse-Geels, H.E., Daha, M.R., Horzinek, M.C., 1980. Isolation and characterization of feline C3 and evidence for the immune complex pathogenesis of feline infectious peritonitis. *J Immunol* 125, 1606-1610.
- Janssen, P.J., Brinkmann, A.O., Boersma, W.J., Van der Kwast, T.H., 1994. Immunohistochemical detection of the androgen receptor with monoclonal

- antibody F39.4 in routinely processed, paraffin-embedded human tissues after microwave pre-treatment. *J Histochem Cytochem* 42, 1169-1175.
- Kennedy, M., Kania, S., Stylianides, E., Bertschinger, H., Keet, D., van Vuuren, M., 2003. Detection of feline coronavirus infection in southern African nondomestic felids. *J Wildl Dis* 39, 529-535.
- Kennedy, M.A., Brenneman, K., Millsaps, R.K., Black, J., Potgieter, L.N., 1998. Correlation of genomic detection of feline coronavirus with various diagnostic assays for feline infectious peritonitis. *J Vet Diagn Invest* 10, 93-97.
- Kipar, A., 2002. Zur Pathogenese der Felinen Infektiösen Peritonitis. Habil. Vet. med. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- Kipar, A., Baptiste, K., Barth, A., Reinacher, M., 2006. Natural FCoV infection: cats with FIP exhibit significantly higher viral loads than healthy infected cats. *J Feline Med Surg* 8, 69-72.
- Kipar, A., Bellmann, S., Kremendahl, J., Kohler, K., Reinacher, M., 1998. Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol* 65, 243-257.
- Kipar, A., May, H., Menger, S., Weber, M., Leukert, W., Reinacher, M., 2005. Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Vet Pathol* 42, 321-330.
- Kipar, A., Bellmann, S., Gunn-Moore, D.A., Leukert, W., Kohler, K., Menger, S., Reinacher, M., 1999. Histopathological alterations of lymphatic tissues in cats without feline infectious peritonitis after long-term exposure to FIP virus. *Vet Microbiol* 69, 131-137.
- Kiss, I., Poland, A.M., Pedersen, N.C., 2004. Disease outcome and cytokine responses in cats immunized with an avirulent feline infectious peritonitis virus (FIPV)-UCD1 and challenge-exposed with virulent FIPV-UCD8. *J Feline Med Surg* 6, 89-97.

- Kiss, I., Kecskemeti, S., Tanyi, J., Klingeborn, B., Belak, S., 2000a. Preliminary studies on feline coronavirus distribution in naturally and experimentally infected cats. *Res Vet Sci* 68, 237-242.
- Kiss, I., Kecskemeti, S., Tanyi, J., Klingeborn, B., Belak, S., 2000b. Prevalence and genetic pattern of feline coronaviruses in urban cat populations. *Vet J* 159, 64-70.
- Klein, J., 1991. *Immunologie*, 1. Edition. Blackwell Scientific Publications, Inc., 533 pp.
- Klumperman, J., Locker, J.K., Meijer, A., Horzinek, M.C., Geuze, H.J., Rottier, P.J., 1994. Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *J Virol* 68, 6523-6534.
- Knudsen, L.M., Pallesen, G., 1986. The preservation and loss of various non-haematopoietic antigens in human post-mortem tissues as demonstrated by monoclonal antibody immunohistological staining. *Histopathology* 10, 1007-1014.
- Kornegay, J.N., 1978. Feline Infectious Peritonitis: The central nervous system form. *J Am Anim Hosp Assoc* 14, 580-584.
- Kummrow, M., Meli, M.L., Haessig, M., Goenczi, E., Poland, A., Pedersen, N.C., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., 2005. Feline coronavirus serotypes 1 and 2: seroprevalence and association with disease in Switzerland. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 1209-1215.
- Kuo, L., Godeke, G.J., Raamsman, M.J., Masters, P.S., Rottier, P.J., 2000. Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. *J Virol* 74, 1393-1406.
- Lai, M.M., 1986. Coronavirus leader-RNA-primed transcription: an alternative mechanism to RNA splicing. *Bioassays* 5, 257-260.
- Lai, M.M., Cavanagh, D., 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 48, 1-100.
- Lai, M.M.C., Holmes, K.V., 2001. Coronaviridae: The viruses and their replication., In: Knipe, D.M., Howley, P. M. et al. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1163-1185.

- Leong, A.S.-Y., 1993. Immunohistochemistry - theoretical and practical aspects., In: Leong, A.S.-Y. Applied immunohistochemistry for the surgical pathologist. Edward Arnold, London.
- Leukert, W., 2002. Untersuchung der Wirksamkeit eines Impfstoffes gegen die Feline Infektiöse Peritonitis unter Tierheimbedingungen. Diss. Vet. med. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- Lim, K.P., Liu, D.X., 2001. The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins. J Biol Chem 276, 17515-17523.
- Linke, R., 1998. Immunologische Techniken, In: Lottspeich, F.Z., H. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, pp. 67-102.
- Locker, J.K., Rose, J.K., Horzinek, M.C., Rottier, P.J., 1992. Membrane assembly of the triple-spanning coronavirus M protein. Individual transmembrane domains show preferred orientation. J Biol Chem 267, 21911-21918.
- Locker, J.K., Klumperman, J., Oorschot, V., Horzinek, M.C., Geuze, H.J., Rottier, P.J., 1994. The cytoplasmic tail of mouse hepatitis virus M protein is essential but not sufficient for its retention in the Golgi complex. J Biol Chem 269, 28263-28269.
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., Myrtek, D., 2004. In situ-Immunlokalisation, In: Der Experimentator Immunologie. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp. 154-177.
- Martinez, J., Ramis, A.J., Reinacher, M., Perpignan, D., 2006. Detection of feline infectious peritonitis virus-like antigen in ferrets. Vet Rec 158, 523.
- Martinez, J., Reinacher, M., Perpignan, D., Ramis, A., 2008. Identification of Group 1 Coronavirus Antigen in Multisystemic Granulomatous Lesions in Ferrets (*Mustela putorius furo*). J Comp Pathol 138, 54-58.
- Masters, P.S., 2006. The molecular biology of coronaviruses, In: Adv. Virus Res., pp. 193-292.

- Meli, M., Kipar, A., Muller, C., Jenal, K., Gonczi, E., Borel, N., Gunn-Moore, D., Chalmers, S., Lin, F., Reinacher, M., Lutz, H., 2004. High viral loads despite absence of clinical and pathological findings in cats experimentally infected with feline coronavirus (FCoV) type I and in naturally FCoV-infected cats. *J Feline Med Surg* 6, 69-81.
- Mighell, A.J., Hume, W.J., Robinson, P.A., 1998. An overview of the complexities and subtleties of immunohistochemistry. *Oral Dis* 4, 217-223.
- Montali, R.J., Strandberg, J.D., 1972. Extraperitoneal lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Pathol* 9, 109-121.
- Montero, C., 2003. The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 51, 1-4.
- Nal, B., Chan, C., Kien, F., Siu, L., Tse, J., Chu, K., Kam, J., Staropoli, I., Crescenzo-Chaigne, B., Escriou, N., van der Werf, S., Yuen, K.Y., Altmeyer, R., 2005. Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. *J Gen Virol* 86, 1423-1434.
- Neu, H., Pfeiffer, E.G., 1985. FIP (Feline Infektiöse Peritonitis): Klinische Frühsymptome und vorausgegangene Belastungen. *Kleintierpraxis* 30, 277-332.
- Neumüller, O.-A., 1973. Römpps Chemie-Lexikon. Franckh'sche Verlagshandlung, pp.
- Nguyen, V.P., Hogue, B.G., 1997. Protein interactions during coronavirus assembly. *J Virol* 71, 9278-9284.
- Olsen, C.W., 1993. A review of feline infectious peritonitis virus: molecular biology, immunopathogenesis, clinical aspects, and vaccination. *Vet Microbiol* 36, 1-37.
- Opstelten, D.J., Raamsman, M.J., Wolfs, K., Horzinek, M.C., Rottier, P.J., 1995a. Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly. *J Cell Biol* 131, 339-349.
- Opstelten, D.J., Raamsman, M.J., Wolfs, K., Horzinek, M.C., Rottier, P.J., 1995b. Coexpression and association of the spike protein and the membrane protein of mouse hepatitis virus. *Adv Exp Med Biol* 380, 291-297.

- Ordóñez, N.G., Manning, J.T., Jr., Brooks, T.E., 1988. Effect of trypsinization on the immunostaining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Am J Surg Pathol* 12, 121-129.
- Osterhaus, A.D., Horzinek, M.C., Ellens, D.J., 1976. [Studies on the etiology of feline infectious peritonitis. Preliminary communication]. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 89, 135-137.
- Pallesen, G., Knudsen, L.M., 1985. Leucocyte antigens in human post mortem tissues: their preservation and loss as demonstrated by monoclonal antibody immunohistological staining. *Histopathology* 9, 791-804.
- Paltrinieri, S., Cammarata, M.P., Cammarata, G., Comazzi, S., 1998a. Some aspects of humoral and cellular immunity in naturally occurring feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol* 65, 205-220.
- Paltrinieri, S., Cammarata Parodi, M., Cammarata, G., Mambretti, M., 1998b. Type IV hypersensitivity in the pathogenesis of FIPV-induced lesions. *Zentralbl Veterinärmed B* 45, 151-159.
- Paul-Murphy, J., Work, T., Hunter, D., McFie, E., Fjelline, D., 1994. Serologic survey and serum biochemical reference ranges of the free-ranging mountain lion (*Felis concolor*) in California. *J Wildl Dis* 30, 205-215.
- Pedersen, N.C., 1976a. Serologic studies of naturally occurring feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res* 37, 1449-1453.
- Pedersen, N.C., 1976b. Morphologic and physical characteristics of feline infectious peritonitis virus and its growth in autochthonous peritoneal cell cultures. *Am J Vet Res* 37, 567-572.
- Pedersen, N.C., 1983. Feline infectious peritonitis and feline enteric coronavirus infections. *Feline Pract* 13, 5-20.
- Pedersen, N.C., 1987a. Virologic and immunologic aspects of feline infectious peritonitis virus infection. *Adv Exp Med Biol* 218, 529-550.

- Pedersen, N.C., 1987b. Coronavirus diseases (coronavirus enteritis, feline infectious peritonitis), In: *Holzworth Diseases of the cat*. Saunders Company, Philadelphia, pp. 193-214.
- Pedersen, N.C., Boyle, J.F., 1980. Immunologic phenomena in the effusive form of feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res* 41, 868-876.
- Pedersen, N.C., Black, J.W., 1983. Attempted immunization of cats against feline infectious peritonitis, using avirulent live virus or sublethal amounts of virulent virus. *Am J Vet Res* 44, 229-234.
- Pedersen, N.C., Floyd, K., 1985. Experimental studies with three new strains of Feline infectious Peritonitis Virus: FIPV-UCD2, FIPV-UCD3, and FIPV-UCD4. *Comp Cont Edu* 7, 1001-1011.
- Pedersen, N.C., Boyle, J.F., Floyd, K., 1981a. Infection studies in kittens, using feline infectious peritonitis virus propagated in cell culture. *Am J Vet Res* 42, 363-367.
- Pedersen, N.C., Boyle, J.F., Floyd, K., Fudge, A., Barker, J., 1981b. An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res* 42, 368-377.
- Pelstring, R.J., Allred, D.C., Esther, R.J., Lampkin, S.R., Banks, P.M., 1991. Differential antigen preservation during tissue autolysis. *Hum Pathol* 22, 237-241.
- Pesteanu-Somogyi, L.D., Radzai, C., Pressler, B.M., 2006. Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds. *J Feline Med Surg* 8, 1-5.
- Pileri, S.A., Roncador, G., Ceccarelli, C., Piccioli, M., Briskomatis, A., Sabattini, E., Ascani, S., Santini, D., Piccaluga, P.P., Leone, O., Damiani, S., Ercolessi, C., Sandri, F., Pieri, F., Leoncini, L., Falini, B., 1997. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *J Pathol* 183, 116-123.
- Pinkus, G.S., O'Connor, E.M., Etheridge, C.L., Corson, J.M., 1985. Optimal immunoreactivity of keratin proteins in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue requires preliminary trypsinization. An immunoperoxidase study of various tumours using polyclonal and monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 33, 465-473.

- Poland, A.M., Vennema, H., Foley, J.E., Pedersen, N.C., 1996. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J Clin Microbiol* 34, 3180-3184.
- Poncelet, L., Coppens, A., Peeters, D., Bianchi, E., Grant, C.K., Kadhim, H., 2008. Detection of antigenic heterogeneity in feline coronavirus nucleocapsid in feline pyogranulomatous meningoencephalitis. *Vet Pathol* 45, 140-153.
- Rader, C., 2001. Antibody libraries in drug and target discovery. *Drug Discov Today* 6, 36-43.
- Ramos-Vara, J.A., 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42, 405-426.
- Ramos-Vara, J.A., Beissenherz, M.E., 2000. Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. *J Vet Diagn Invest* 12, 307-311.
- Reinacher, M., 1994. Pathogenese und Diagnose von natürlich auftretenden Infektionen mit dem Felinen Infektiösen Peritonitis Virus. In: Symposium "Neue Perspektiven zur Bekämpfung der Felinen Infektiösen Peritonitis, Berlin.
- Reinacher, M., Theilen, G., 1987. Frequency and significance of feline leukemia virus infection in necropsied cats. *Am J Vet Res* 48, 939-945.
- Risco, C., Anton, I.M., Enjuanes, L., Carrascosa, J.L., 1996. The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. *J Virol* 70, 4773-4777.
- Roelke, M.E., Forrester, D.J., Jacobson, E.R., Kollias, G.V., Scott, F.W., Barr, M.C., Evermann, J.F., Pirtle, E.C., 1993. Seroprevalence of infectious disease agents in free-ranging Florida panthers (*Felis concolor coryi*). *J Wildl Dis* 29, 36-49.
- Rohrbach, B.W., Legendre, A.M., Baldwin, C.A., Lein, D.H., Reed, W.M., Wilson, R.B., 2001. Epidemiology of feline infectious peritonitis among cats examined at veterinary medical teaching hospitals. *J Am Vet Med Assoc* 218, 1111-1115.

- Rohrer, C., Suter, P.F., Lutz, H., 1993. Die Diagnostik der feline infektiösen Peritonitis (FIP): Retrospektive und prospektive Untersuchungen. *Kleintierpraxis* 6, 379-389.
- Sachs, L., 2004. *Angewandte Statistik*, 11 Edition. Springer-Verlag, 890 pp.
- Sanchez, C.M., Jimenez, G., Laviada, M.D., Correa, I., Sune, C., Bullido, M., Gebauer, F., Smerdou, C., Callebaut, P., Escribano, J.M., et al., 1990. Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology* 174, 410-417.
- Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., 1998. A new model for coronavirus transcription. *Adv Exp Med Biol* 440, 215-219.
- Seelig, H.P., Seelig, R., Drescher, M., 1975. [Influence of autolysis on the immunohistology of tissue-bound immunoglobulins in the kidney (author's transl)]. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 365, 151-161.
- Shi, S.R., Cote, R.J., Taylor, C.R., 1997. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem* 45, 327-343.
- Shi, S.R., Cote, R.J., Taylor, C.R., 2001. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem* 49, 931-937.
- Shi, S.R., Imam, S.A., Young, L., Cote, R.J., Taylor, C.R., 1995. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 43, 193-201.
- Siddell, S., Wege, H., ter Meulen, V., 1982. The structure and replication of coronaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 99, 131-163.
- Simkins, R.A., Saif, L.J., Weilnau, P.A., 1989. Epitope mapping and the detection of transmissible gastroenteritis viral proteins in cell culture using biotinylated monoclonal antibodies in a fixed-cell ELISA. *Arch Virol* 107, 179-190.
- Simons, F.A., Vennema, H., Rofina, J.E., Pol, J.M., Horzinek, M.C., Rottier, P.J., Egberink, H.F., 2005. A mRNA PCR for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Virol Methods* 124, 111-116.

- Slauson, D.O., Finn, J.P., 1972. Meningoencephalitis and panophthalmitis in feline infectious peritonitis. *J Am Vet Med Assoc* 160, 729-734.
- Spaan, W., Cavanagh, D., Horzinek, M.C., 1988. Coronaviruses: structure and genome expression. *J Gen Virol* 69, 2939-2952.
- Sparkes, A.H., Gruffydd-Jones, T.J., Howard, P.E., Harbour, D.A., 1992. Coronavirus serology in healthy pedigree cats. *Vet Rec* 131, 35-36.
- Sternberger, L.A., 1979. The unlabeled antibody (PAP) method, introduction. *J Histochem Cytochem* 27, 1657.
- Stoddart, C.A., Scott, F.W., 1988. Isolation and identification of feline peritoneal macrophages for in vitro studies of coronavirus-macrophage interactions. *J Leukoc Biol* 44, 319-328.
- Stoddart, C.A., Scott, F.W., 1989. Intrinsic resistance of feline peritoneal macrophages to coronavirus infection correlates with in vivo virulence. *J Virol* 63, 436-440.
- Straus, W., 1974. Letter: Cleavage of heme from horseradish peroxidase by methanol with inhibition of enzymic activity. *J Histochem Cytochem* 22, 908-911.
- Straus, W., 1980. Factors affecting the sensitivity and specificity of the cytochemical reaction for the anti-horseradish peroxidase antibody in lymph tissue sections. *J Histochem Cytochem* 28, 645-652.
- Streefkerk, J.G., 1972. Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. *J Histochem Cytochem* 20, 829-831.
- Sturman, L.S., Holmes, K.V., Behnke, J., 1980. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J Virol* 33, 449-462.
- Swift, A.M., Machamer, C.E., 1991. A Golgi retention signal in a membrane-spanning domain of coronavirus E1 protein. *J Cell Biol* 115, 19-30.

- Takano, T., Hohdatsu, T., Hashida, Y., Kaneko, Y., Tanabe, M., Koyama, H., 2007. A "possible" involvement of TNF-alpha in apoptosis induction in peripheral blood lymphocytes of cats with feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 119, 121-131.
- Tammer, R., 1996. Immunhistologischer Nachweis von Antigen des Virus der Felines Infektiösene Peritonitis bei Sektionskatzen. Diss. Vet. med. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- Tammer, R., Evensen, O., Lutz, H., Reinacher, M., 1995. Immunohistological demonstration of feline infectious peritonitis virus antigen in paraffin-embedded tissues using feline ascites or murine monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 49, 177-182.
- Taylor, C.R., Tandon, A., 1994. Theoretical and practical aspects of the different immunoperoxidase techniques, In: Taylor, C.R., Cote, R. J. *Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical pathologist*. Saunders, W. B., Philadelphia.
- Vennema, H., 1999. Genetic drift and genetic shift during feline coronavirus evolution. *Vet Microbiol* 69, 139-141.
- Vennema, H., Poland, A., Floyd Hawkins, K., Pedersen, N.C., 1995. A comparison of the genomes of FECVs and FIPVs and what they tell us about the relationships between feline coronavirus and their evolution. *Feline Pract* 23, 40-44.
- Vennema, H., Poland, A., Foley, J., Pedersen, N.C., 1998. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology* 243, 150-157.
- Vennema, H., de Groot, R.J., Harbour, D.A., Dalderup, M., Gruffydd-Jones, T., Horzinek, M.C., Spaan, W.J., 1990. Early death after feline infectious peritonitis virus challenge due to recombinant vaccinia virus immunization. *J Virol* 64, 1407-1409.
- Vennema, H., Godeke, G.J., Rossen, J.W., Voorhout, W.F., Horzinek, M.C., Opstelten, D.J., Rottier, P.J., 1996. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *Embo J* 15, 2020-2028.

- Vis, A.N., Kranse, R., Nigg, A.L., van der Kwast, T.H., 2000. Quantitative analysis of the decay of immunoreactivity in stored prostate needle biopsy sections. *Am J Clin Pathol* 113, 369-373.
- Walter, J., Hahn, S., 1999. *Angewandte Immunhistochemie. Theorie und Praxis.* Selbstdruck, pp.
- Ward, J.M., Gribble, D.H., Dungworth, D.L., 1974. Feline infectious peritonitis: experimental evidence for its multiphasic nature. *Am J Vet Res* 35, 1271-1275.
- Watt, N.J., MacIntyre, N.J., McOrist, S., 1993. An extended outbreak of infectious peritonitis in a closed colony of European wildcats (*Felis silvestris*). *J Comp Pathol* 108, 73-79.
- Weber, M., 2000. Pathologische und immunhistologische Untersuchungen am Auge von Katzen mit feliner infektiöser Peritonitis. *Vet. Med. Diss. Leipzig.*
- Wege, H., Siddell, S., ter Meulen, V., 1982. The biology and pathogenesis of coronaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 99, 165-200.
- Weiss, R.C., Scott, F.W., 1981a. Pathogenesis of feline infectious peritonitis: nature and development of viremia. *Am J Vet Res* 42, 382-390.
- Weiss, R.C., Scott, F.W., 1981b. Pathogenesis of feline infectious peritonitis: pathologic changes and immunofluorescence. *Am J Vet Res* 42, 2036-2048.
- Weiss, R.C., Scott, F.W., 1981c. Antibody-mediated enhancement of disease in feline infectious peritonitis: comparisons with dengue hemorrhagic fever. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 4, 175-189.
- Weiss, R.C., Dodds, W.J., Scott, F.W., 1980. Disseminated intravascular coagulation in experimentally induced feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res* 41, 663-671.
- Werner, M., Chott, A., Fabiano, A., Battifora, H., 2000. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 24, 1016-1019.

- Wichmann-Schauer, H., 1990. Untersuchungen zum immunhistochemischen Nachweis von Virusantigen und Immunkomplexen bei der Feline Infektiösen Peritonitis (FIP). Diss. Vet. med. Freie Universität, Berlin.
- Wintzer, H.O., Amberg, R., von Kleist, S., Forster, B., 1988. Immunohistological demonstration of lymphocyte surface antigens in postmortem lymphoid tissues. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 413, 581-589.
- Wittmer, G., 1993. Statistische Untersuchungen zur Infektion mit dem Feline Leukämievirus (FeLV) bei Sektionskatzen. Diss. Vet. med. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- Wolfe, L.G., Griesemer, R.A., 1966. Feline infectious peritonitis. *Pathol Vet* 3, 255-270.
- Wolfe, L.G., Griesemer, R.A., 1971. Feline infectious peritonitis: review of gross and histopathologic lesions. *J Am Vet Med Assoc* 158, 987-993.
- Wurm, T., Chen, H., Hodgson, T., Britton, P., Brooks, G., Hiscox, J.A., 2001. Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins, and the protein may disrupt host cell division. *J Virol* 75, 9345-9356.
- Yount, B., Curtis, K.M., Baric, R.S., 2000. Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model. *J Virol* 74, 10600-10611.
- Zook, B.C., 1968. Ultrastructural evidence for the viral etiology of feline infectious peritonitis. *Pathol Vet* 5, 91-95.

9 Abbildungen

Abbildung 9.1:

Antikörper: FCV3-70 (N-Protein)

Ag-Retrieval: TUF[®]

Nachweismethode: PAP

Vergrößerung: 40xObj.

Die immunhistologische Markierung mit dem mAk FCV3-70 (Pfeile) ist kaum zu erkennen.

Abbildung 9.2:

Antikörper: FCV3-70 (N-Protein)

Ag-Retrieval: Zitratpuffer pH-Wert: 6,0

Nachweismethode: PAP

Vergrößerung: 40xObj.

Die immunhistologische Markierung mit dem mAk FCV3-70 an demselben Granulom wie in Abbildung 9.1, aber diesmal mit einer anderen Vorbehandlung, ist hier leicht zu erkennen.

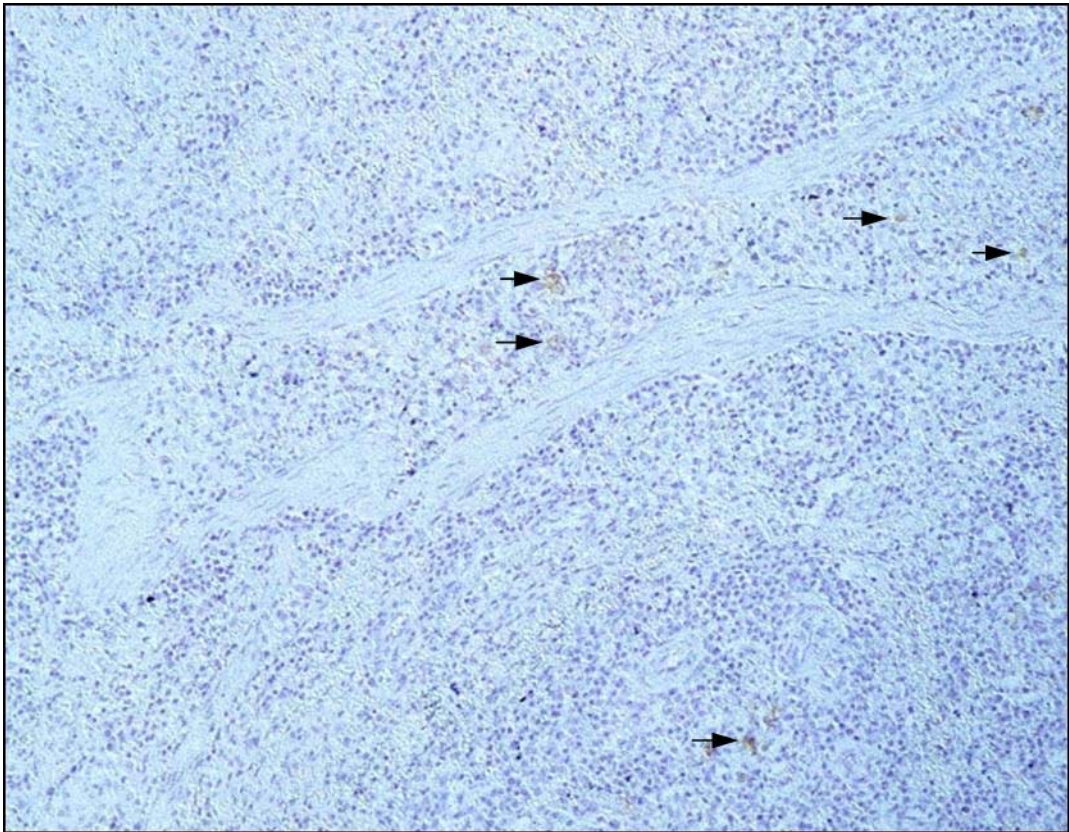


Abbildung 9.1

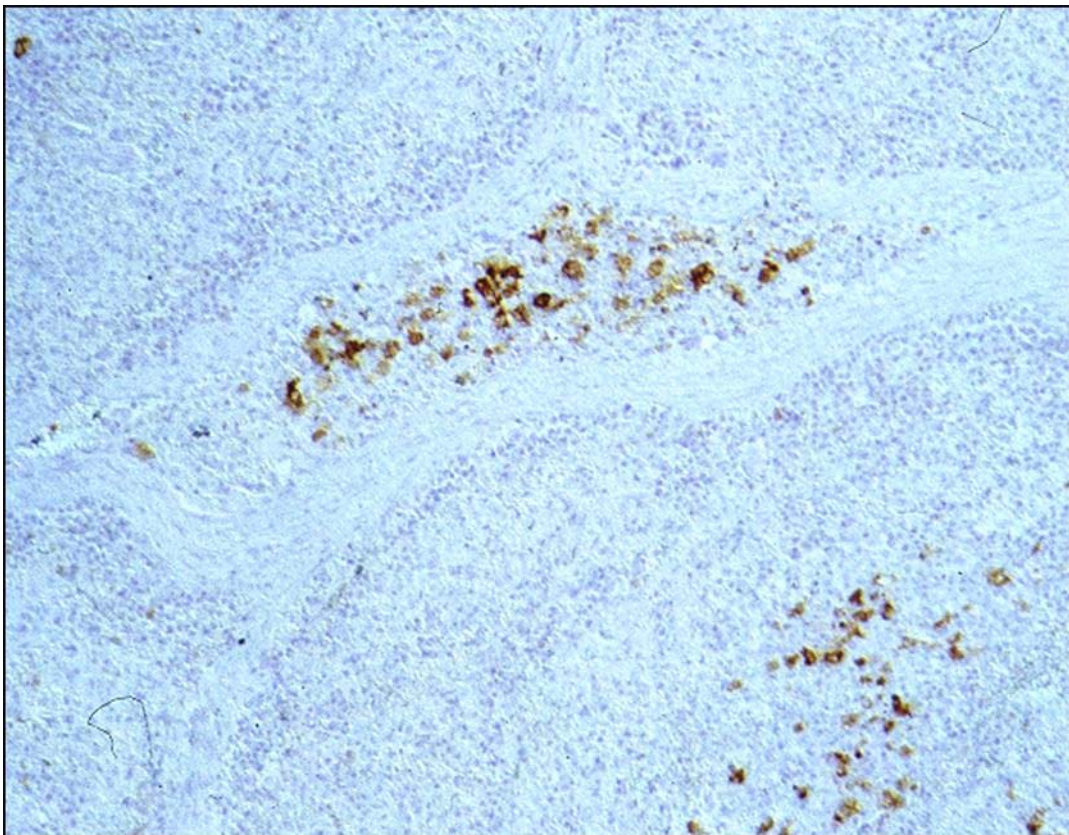


Abbildung 9.2

Abbildung 9.3:

Antikörper: Cocktail (N-, M-, S-Protein)

Ag-Retrieval: DTRS® + Zitratpuffer pH-Wert 6,0

Nachweismethode: PAP

Vergrößerung: 2,5xObj.

RI von 3: Die immunhistologische Reaktion ist schon mit dem 2,5er Objektiv zu erkennen.

Abbildung 9.4:

Antikörper: 52D5 (N-Protein)

Ag-Retrieval: Zitratpuffer (pH-Wert 6,0)

Nachweismethode: PAP

Vergrößerung: 10xObj.

RI von 2: Die immunhistologische Reaktion ist erst mit dem 10er Objektiv zu erkennen.

Abbildung 9.5:

Antikörper: FCV3-70 (N-Protein)

Ag-Retrieval: Zitratpuffer (pH-Wert 6,0)

Nachweismethode: PAP

Vergrößerung: 40xObj.

RI von 1: Die immunhistologische Reaktion ist nur noch mit dem 40er Objektiv zu erkennen.

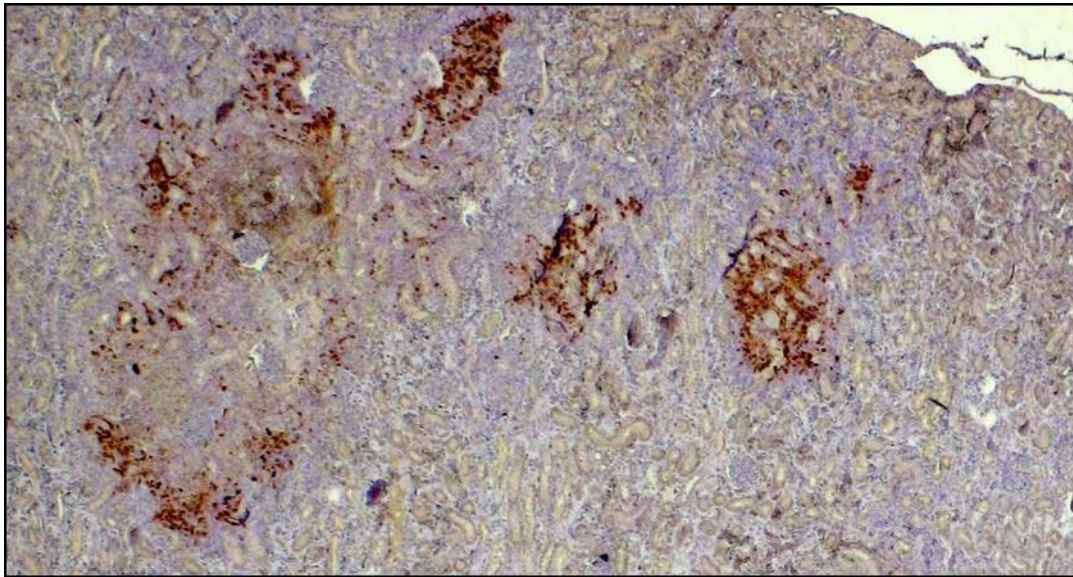


Abbildung 9.3

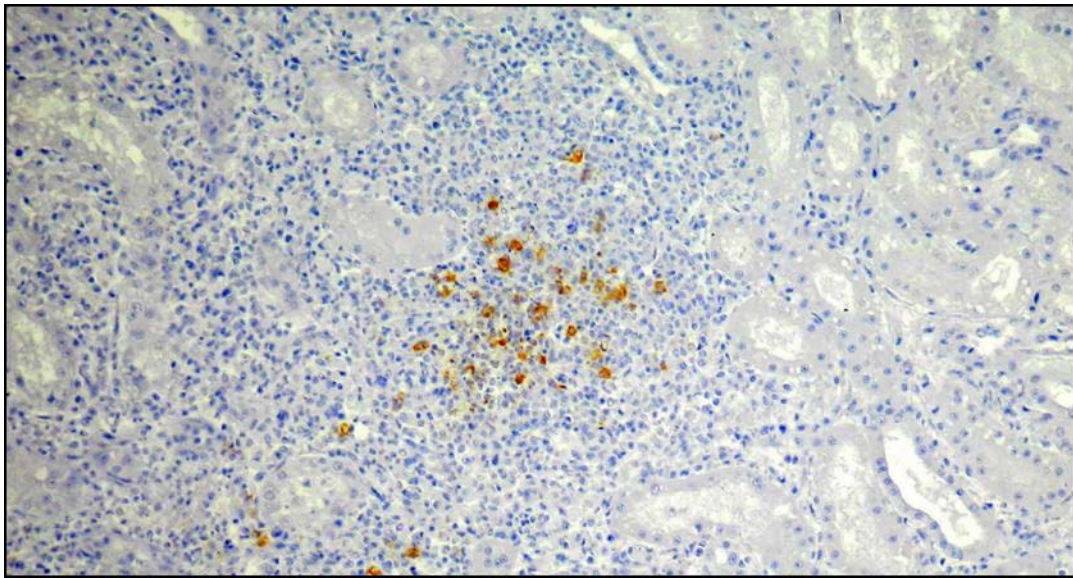


Abbildung 9.4

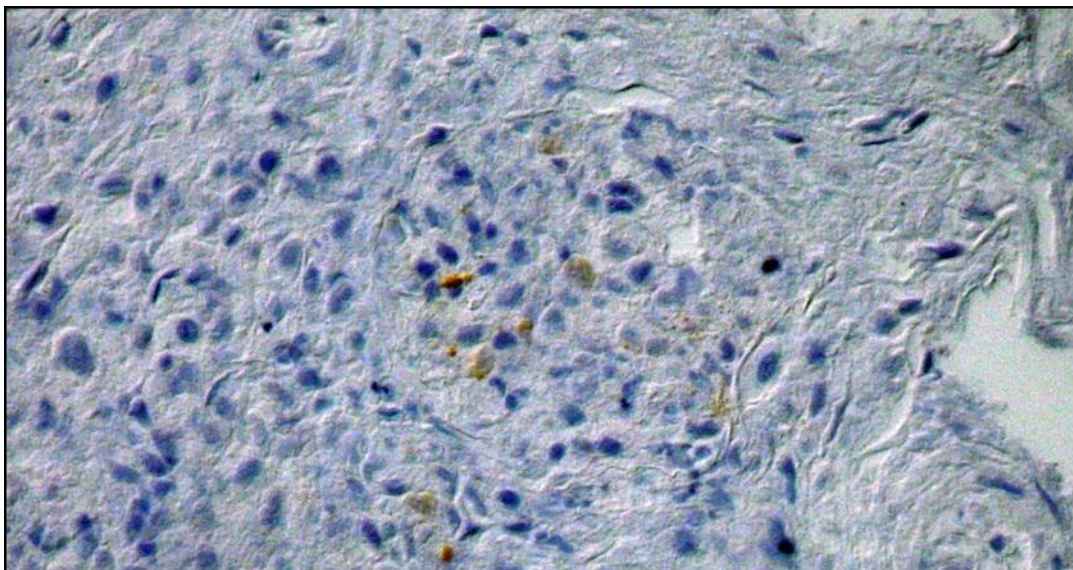


Abbildung 9.5

Abbildung 9.6:

Antikörper: 1F12 (S-Protein)

Ag-Retrieval: DTRS®

Nachweismethode: PAP

Vergrößerung: 40xObj.

Die immunhistologische Markierung mit dem mAk ist relativ schwach zu erkennen.

Abbildung 9.7

Antikörper: 52D5 (N-Protein)

Ag-Retrieval: DTRS®

Nachweismethode: PAP

Vergrößerung: 2,5xObj.

Die immunhistologische Markierung an dem selben Granulom (Serienschnitt) wie in Abbildung 9.6 ist hier mit dem mAk 52D5 schon mit dem 2,5 x Objektiv zu erkennen.

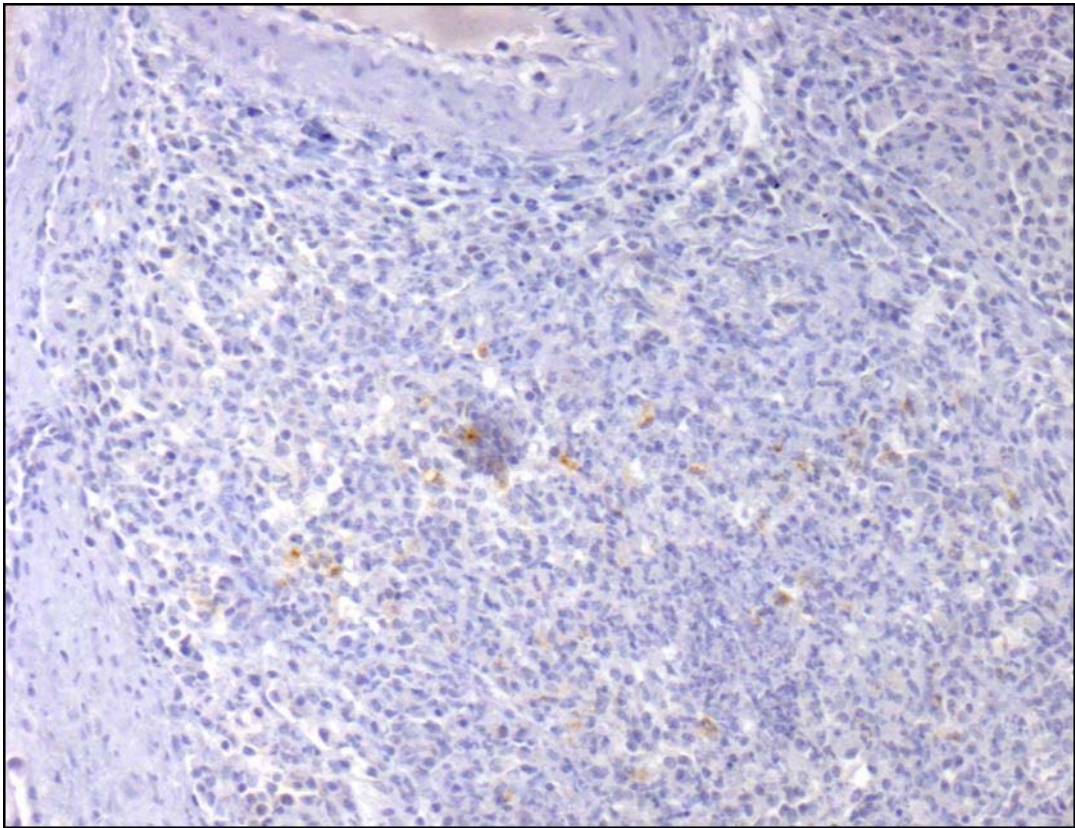


Abbildung 9.6

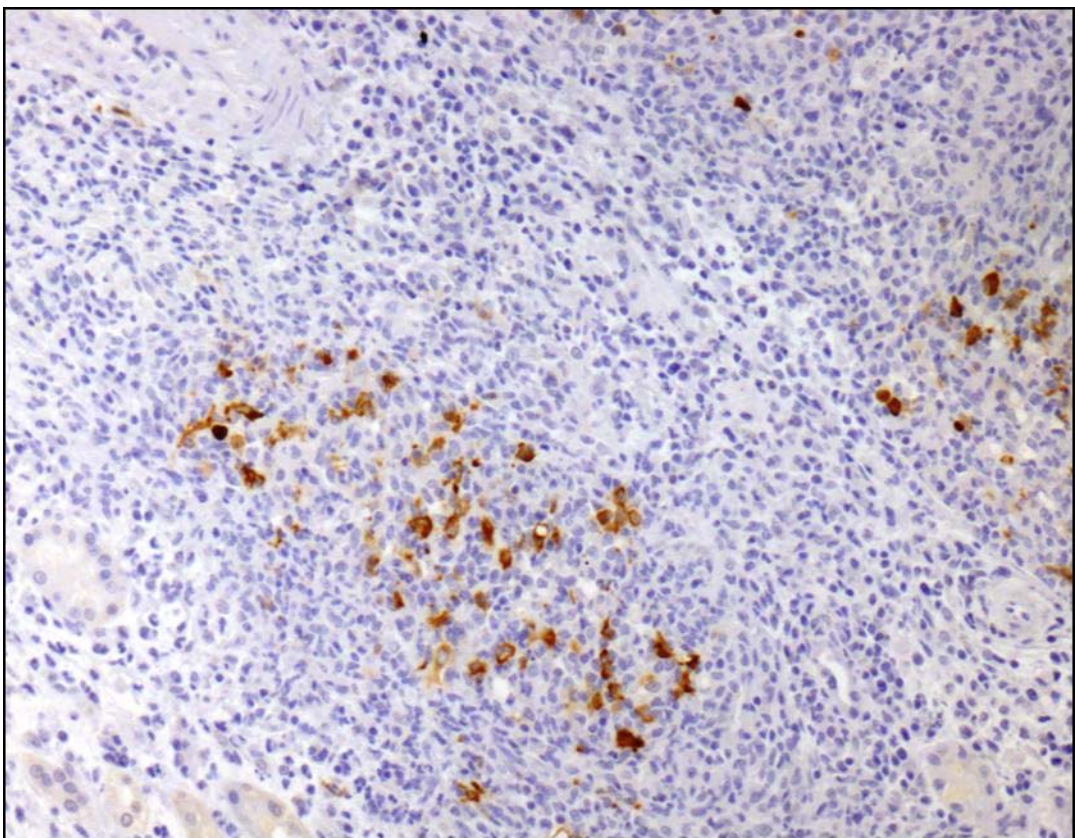


Abbildung 9.7

Abbildung 9.8:

Antikörper: FCV3-70 (N-Protein)

Ag-Retrieval: Zitratpuffer pH-Wert 6,0

Nachweismethode: PAP

Vergrößerung: 2,5xObj.

Die immunhistologische Markierung ist bei Verwendung des Antikörpers FCV3-70 relativ schwach zu erkennen.

Abbildung 9.9:

Antikörper: Cocktail (N-, M-, S-Protein)

Ag-Retrieval: DTRS[®] + Zitratpuffer pH-Wert 6,0

Nachweismethode: PAP

Vergrößerung: 40xObj.

Die immunhistologische Markierung am Serienschnitt desselben Granuloms wie in Abbildung 9.8 ist bei Verwendung des Cocktails gut zu erkennen.

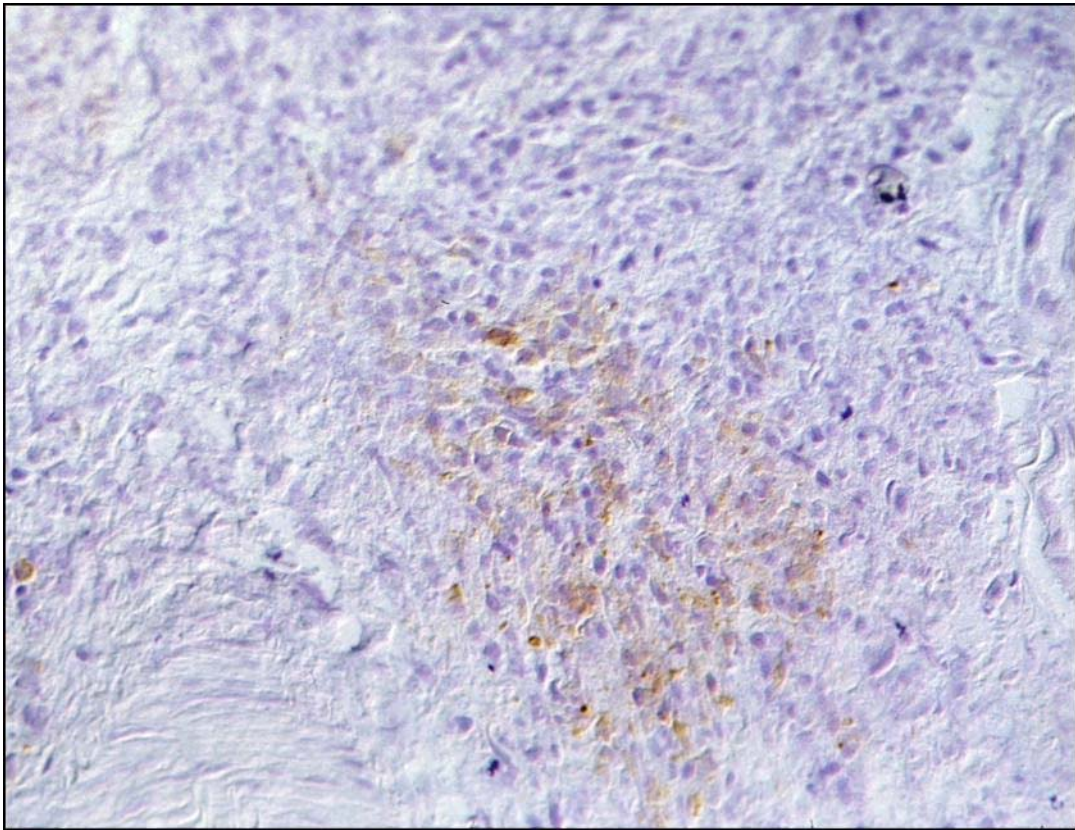


Abbildung 9.8

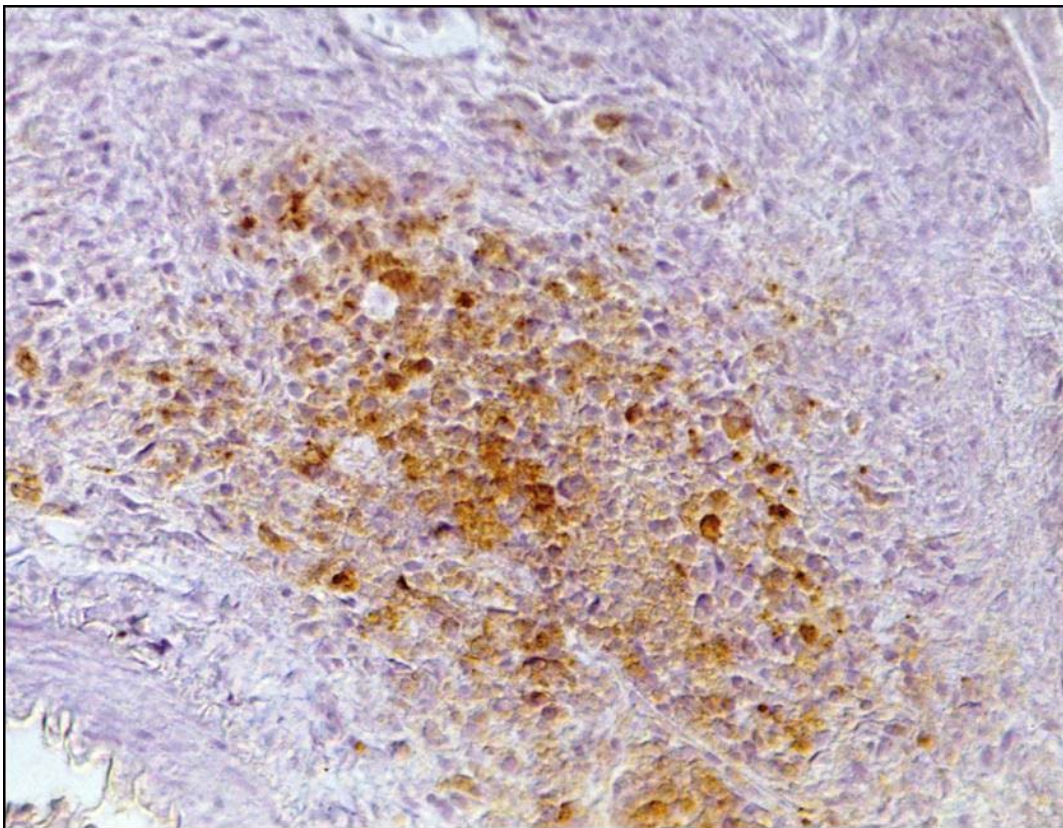


Abbildung 9.9

Abbildung 9.10:

Antikörper: Cocktail (N-, M-, S-Protein)

Ag-Retrieval: DTRS® + Zitratpuffer pH-Wert 6,0

Nachweismethode: PAP

Vergrößerung: 40xObj.

Die immunhistologische Markierung eines Granuloms, das in den Frischegrad „faul“ eingestuft wurde, ist nicht mehr immer bestimmten Zellen zuzuordnen, sondern erscheint weniger scharf begrenzt.

Abbildung 9.11:

Antikörper: Cocktail (N-, M-, S-Protein)

Ag-Retrieval: DTRS® + Zitratpuffer pH-Wert 6,0

Nachweismethode: PAP

Vergrößerung: 40xObj.

Die immunhistologische Markierung eines Granuloms, das in den Frischegrad „frisch“ eingestuft wurde, ist schärfer zellulär begrenzt als in Abbildung 9.10.

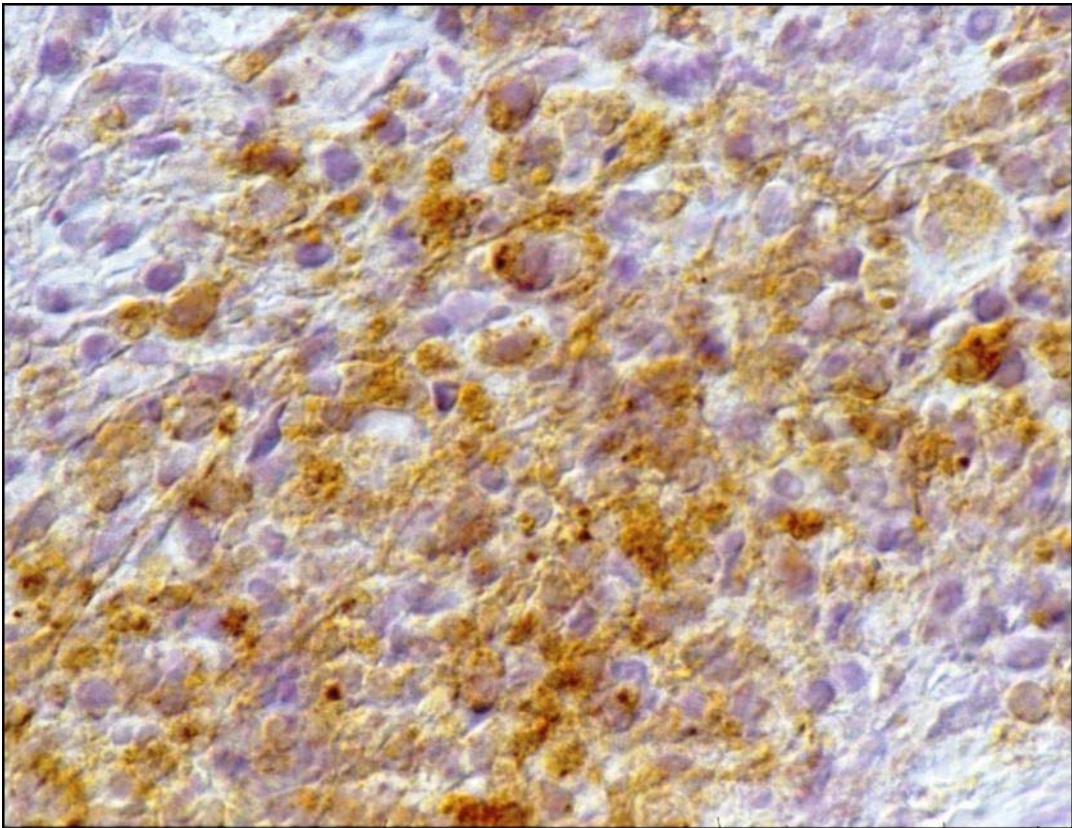


Abbildung 9.10

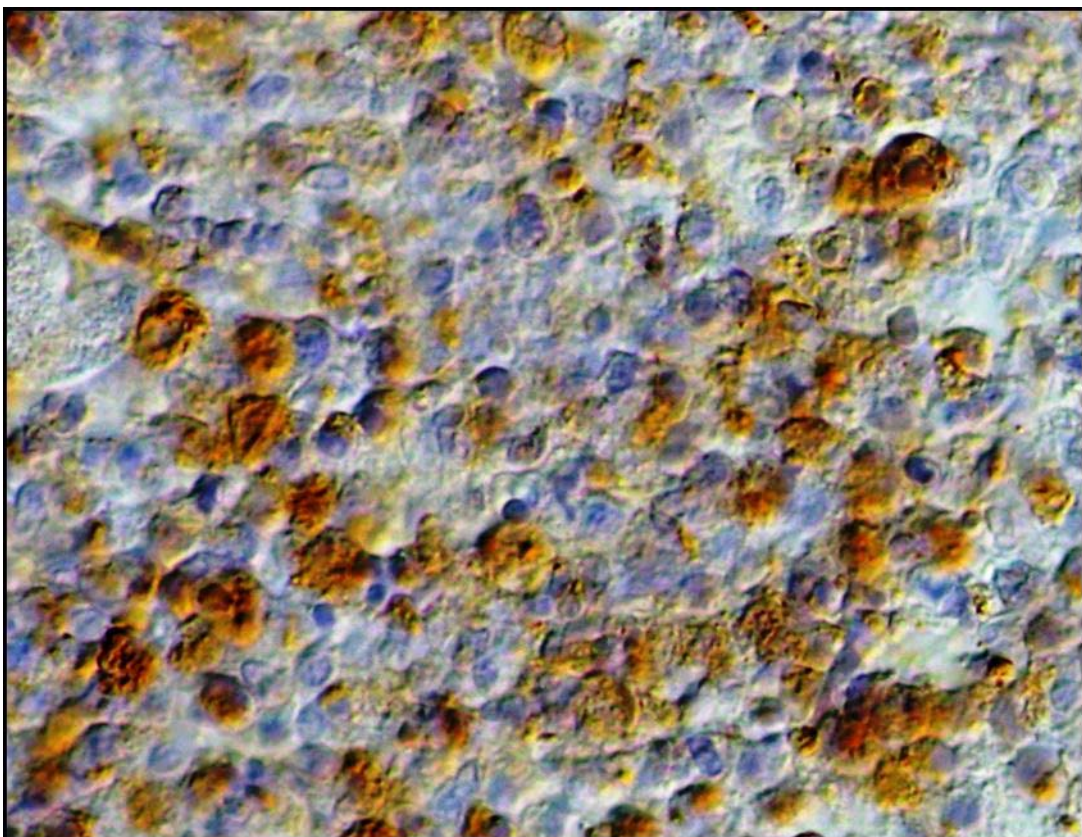


Abbildung 9.11

Abbildung 9.12:

Antikörper: FCV3-70

Ag-Retrieval: Zitratpuffer pH-Wert 6,0

Nachweismethode: PAP

Vergrößerung: 40xObj.

Der Nachweis der FIP-Erkrankung verlief bei der Katze s672/03 mit dem Standardantikörper FCV3-70 mit negativem Ergebnis.

Abbildung 9.13:

Antikörper: Cocktail (N-, M-, S-Protein)

Ag-Retrieval: DTRS[®] + Zitratpuffer pH-Wert 6,0

Nachweismethode: PAP

Vergrößerung: 40xObj.

Der Nachweis der FIP-Erkrankung verlief bei der Katze s672/03 mit dem „Cocktail“ mit positivem Ergebnis.

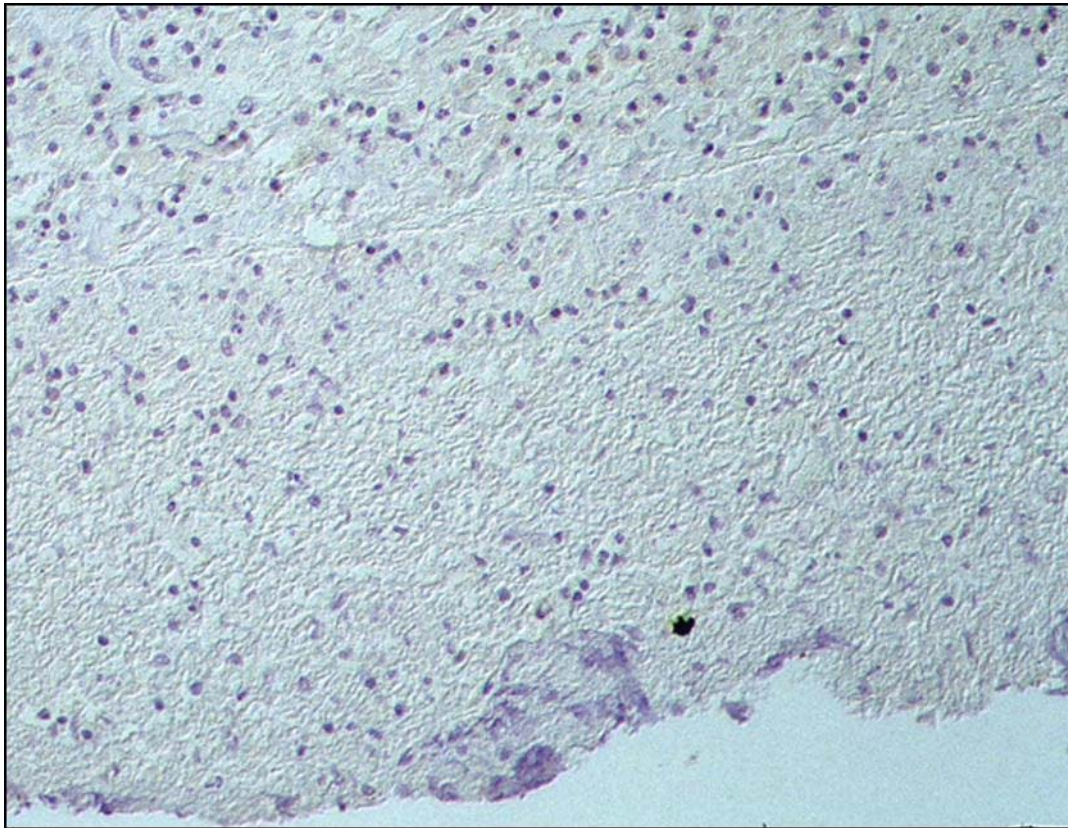


Abbildung 9.12

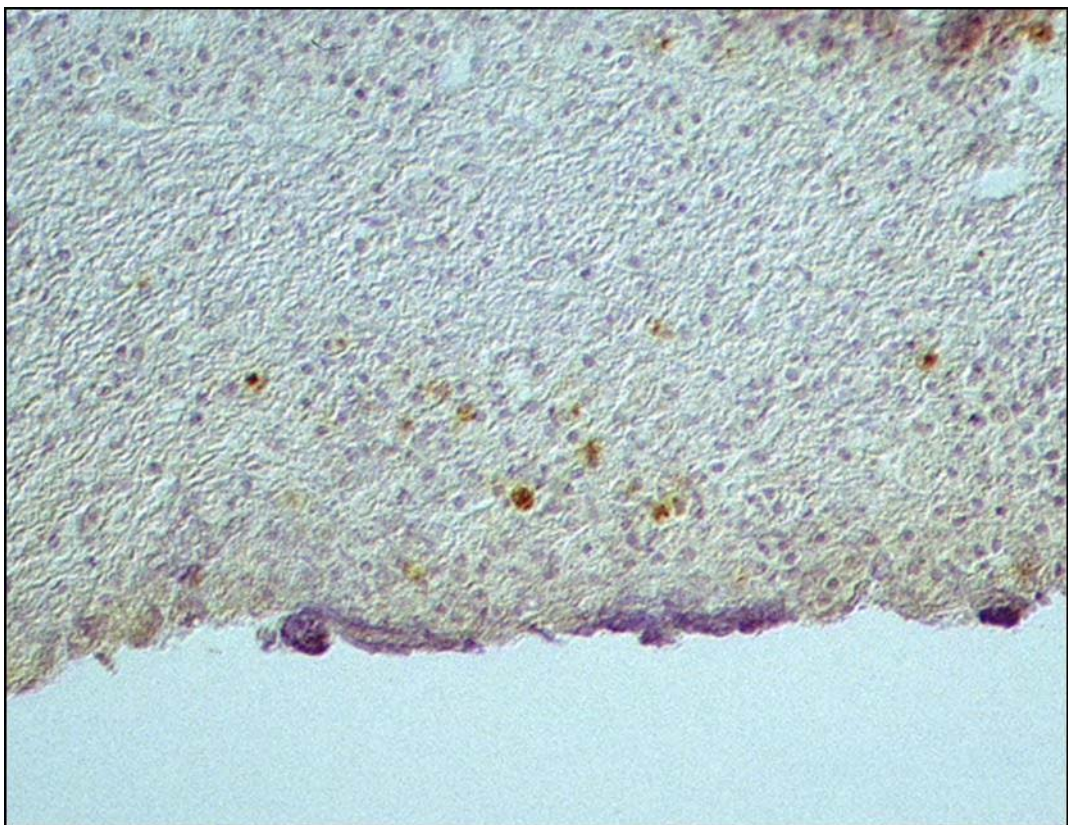


Abbildung 9.13

10 Anhang

10.1 Tabellen

Tabelle 10.1: Anamnese sowie pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde der Katzen, die in der Antikörperversuchsreihe und in der semiquantitativen Bewertung des FCV3-70 verwendet wurden				
Tgbnr., Rasse, Alter, Geschlecht, Frischegrad	Anamnese	Pathologische anatomische Befunde	Pathologisch-histologische Befunde	Diagnose
s1139/02, Katze, 7 Monate, m, nicht mehr frisch	seit 1 Woche Uveitis, Ikterus, Verdacht: generalisierte Abszedierung Streptotrichose, Nocardiose	Ikterus, Abmagerung, granulomatöse Peritonitis, Granulome bis erbsengroß in beiden Nieren, Leber, stecknadelkopfgroße Knoten in beiden Lungenlappen, Lunge: Stauung und Ödem, Netz: zahlreiche stecknadelspitzgroße Granulome	Leber: ausgeprägte granulomatös-nekrotisierende Entzündung mit deutlicher Fibrose Lunge, Niere, großes Netz, Darm, Lymphknoten: granulomatös-nekrotisierende Meningitis, einzelne kleine Granulome im Plexus choroideus und mononukleäre perivaskuläre Infiltrate um ventrikelnaher Gefäße; Auge: granulomatös-nekrotisierende Iridozyklitis mit Fibrinablagerungen in der vorderen Augenkammer	trockene Form der FIP
s2102/02, Katze, EKH, 3 Jahre, mk, nicht mehr frisch	FIP-Verdacht, rezidivierendes Fieber, Bronchitis, Pneumonie, Lungenabstrich: massenhaft E. coli, neurologische Ausfallserscheinungen: Anisokorie, Aszites, Dyspnoe	2 ml Thoraxerguss, Fibringemisch auf Perikard, 3 ml Aszites, Lunge, Leber, Milz: multiple Granulome	Niere: ausgedehnte eitrig-nekrotisierende interstitielle Nephritis, Lunge: multipel herdförmige nekrotisierende Pneumonie, Milz: pulpöse Hyperplasie	exsudative Form der FIP
s2378/02, Norwegische Waldkatze, 8 Monate, w, frisch	Coronavirustiter: 1:800, Nickhautvorfall, kein Kotabsatz, Anorexie	ggr. Anämie, serofibrinöse Peritonitis und Pleuritis, Netz, Mesenteriallkn, Niere: multifokale Granulome; Lunge: alveoläres Emphysem und Ödem	Niere, Pleura, Zwerchfell, großes Netz, Mesenteriallkn: granulomatös-nekrotisierende Entzündung mit stellenweise ausgeprägten	exsudative Form der FIP

Tabelle 10.1 (Fortsetzung): Anamnese sowie pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde der Katzen, die in der Antikörperversuchsreihe und in der semiquantitativen Bewertung des FCV3-70 verwendet wurden				
Tgbnr., Rasse, Alter, Geschlecht, Frischegrad	Anamnese	Pathologische Befunde	Pathologisch-histologische Befunde	Diagnose
s129/03, EKH, 5,5 Jahre, mk, faul	Fieber, Niere vergrößert, Flüssigkeit im Thorax	ggr. Ikterus, hgr. granulomatöse Nephritis, fibrinöse Pleuritis mit serohämorrhagischen Erguss	Fibrinablagerungen, Knochenmark: sehr zellreich Gehirn: multiple Granulome in der Leptomeninge, Leber: multifokale frische Nekrosen, Lunge: multifokale granulomatös-nekrotisierende Pleuritis, alveoläres Ödem, Niere: multiple Pyogranulome, Milz: multifokale Nekroseherde, Lnn: folliculäre Depletion, hyalinisierte Follikelzentren	exsudative Form der FIP
s261/03, BKH, 4,5 Monate, w, relativ frisch	epileptische Anfälle	hgr. granulomatöse Nephritis, ggr. granulomatöse Meningitis,	Niere, Pleura, Meningen, Pleura, Plexus choroideus: ausgeprägte granulomatös-nekrotisierende Entzündung	trockene Form der FIP
s291/03, Katze, w, relativ frisch	wegen FIP-Verdacht euthanasiert	Bauchhöhle: 20 ml bernsteinfarbenes, klares, gelierendes Exsudat, Peritoneum, Leber, Niere, Milz: mgr. multifokale hellbraune Knötchen an der Oberfläche, Brusthöhle: 5 ml rötlichgelbes gelierendes Exsudat, Pleura, Lunge: ggr. multifokale hellbraune Knötchen	Niere, Pleura, Mesenterium: granulomatös-nekrotisierende Entzündung, Milz: mäßige folliculäre Hyperplasie mit Lymphozytendepletion der Follikelzentren	exsudative Form der FIP

Tabelle 10.1 (Fortsetzung): Anamnese sowie pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde der Katzen, die in der Antikörperversuchsreihe und in der semiquantitativen Bewertung des FCV3-70 verwendet wurden				
Tgbnr., Rasse, Alter, Geschlecht, Frischegrad	Anamnese	Pathologisch-anatomische Befunde	Pathologisch-histologische Befunde	Diagnose
s293/03, Katze, frisch	FIP-Verdacht	Mesenterialltn, Leber, Niere, Lunge Pleura: granulomatöse Entzündung, Milz: follikuläre Hyperplasie	Mesenterialltn, Leber, Niere, Lunge, Meningen: granulomatös-nekrotisierende Entzündung	trockene Form der FIP
s327/03, Katze, relativ frisch	Atemnot, Ikterus, FIP-Verdacht	250 ml gelbrötliche gelatinöser Hydrothorax, seröse und granulomatöse Peritonitis, Lunge, Niere: granulomatöse Entzündung	Niere: ausgeprägte granulomatös-nekrotisierende Entzündung, in einer Lokalisation mit Arrosion einer Venae stellatae mit frischem Thrombus sowie einzelne frische Infarkte, Zwerchfell, Lunge: granulomatös-nekrotisierende Pleuritis, Milz: Follikelhyperplasie mit Lymphknotendepletion in den Follikelzentren, Gehirn: granulomatös-nekrotisierende Meningitis	exsudative Form der FIP
s343/03, EKH, 1/2 Jahr, m, frisch	ZNS-Symptome, FIP?	gefäßassoziierte Granulome in beiden Nieren, follikuläre Milzhyperplasie, ggr. akutes alveoläres Lungenemphysem, Granulome in den Meningen	Niere: granulomatös-nekrotisierende Entzündung v. a. um Gefäße, Gehirn: granulomatös-nekrotisierende Meningitis, Milz: follikuläre Hyperplasie mit Lymphozytendepletion in den Follikelzentren	trockene Form der FIP

Tabelle 10.1 (Fortsetzung): Anamnese sowie pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde der Katzen, die in der Antikörperversuchsreihe und in der semiquantitativen Bewertung des FCV3-70 verwendet wurden				
Tgbnr., Rasse, Alter, Geschlecht, Frischegrad	Anamnese	Pathologische anatomische Befunde	Pathologisch-histologische Befunde	Diagnose
s634/03, Main Coon, 8 Monate, m, faul	Schnupfen, Nasen- Augenausfluß, Fieber, epileptiforme Anfälle	Niere: gefäßassoziierte granulomatöse Nephritis	Niere: hgr. granulomatös- nekrotisierende Entzündung mit Fibrinauflagerungen, Leber, Milz: faul, soweit beurteilbar vereinzelte Granulome, Augen: bds. granulomatöse Iridozyklitis, Gehirn: granulomatöse Meningitis und Plexuschorioiditis sowie einzelne kleine Granulome im ventrikelnahem Parenchym	trockene Form der FIP
s1582/03, BKH, 5 Monate, m, relativ frisch	am 18.3. verkauft, beim neuen Besitzer Inappetenz, Fieber, Ikterus, Peritonitis	mgr. Ikterus, Bauchhöhle: ca. 40 ml einer gelben faden ziehenden Flüssigkeit, exsudative granulomatöse Peritonitis, Leber, Milz, Pankreas, Netz: Granulome	Gehirn: herdförmige granulomatöse Meningitis, Leber, Netz, Mesenterium, Milz: granulomatös-nekrotisierende Entzündung	exsudative Form der FIP
s1597/03, Perser-mix, adult, w, frisch	Nystagmus, zittern, Koordinationsstörungen, FIP?	Nieren: im Bereich der V. stellatae Granulome, MesLnn: granulomatöse Lymphadenitis	Gehirn: multifokale granulomatöse Leptomeningitis und Plexus Chorioiditis, herdförmige ausgeprägte granulomatös-nekrotisierende Nephritis, granulomatöse Lymphadenitis	trockene Form der FIP

Tabelle 10.1 (Fortsetzung): Anamnese sowie pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde der Katzen, die in der Antikörperversuchsreihe und in der semiquantitativen Bewertung des FCV3-70 verwendet wurden				
Tgbnr., Rasse, Alter, Geschlecht, Frischegrad	Anamnese	Pathologisch-anatomische Befunde	Pathologisch-histologische Befunde	Diagnose
s1624/03, Norwegische Waldkatze, 5 Monate, m, nicht mehr frisch	FIP-Verdacht	hgr. Ikterus, exsudative Peritonitis, Pleuritis, Perikarditis, Nieren: rotweiß marmoriert	Gehirn: multifokale mgr. perivaskuläre gemischtzellige Infiltrate, Niere: hgr. v. a. subkapsuläre perivaskuläre gemischtzellige Infiltrate	trockene Form der FIP
s82/04, EKH, 7 Monate, m, relativ frisch	Katzenschnupfensymptome, FIP-Verdacht	Brusthöhle: ggr. serofibrinöser Erguss, herdförmige granulomatöse Nephritis, Gehirn: submiliare Granulome in den Meningen	Mesenterium: granulomatös-nekrotisierende Entzündung, Lunge: vereinzelte Granulome in der Pleura und im Parenchym, Harnblase: stellenweise subseröse und interstitielle Blutungen mit herdförmigen Makrophagen Infiltrationen in der Wand, Gehirn: ausgeprägte granulomatös-nekrotisierende Periventrikulitis sowie lymphoplasmazelluläre Infiltrate, Rückenmark: granulomatös-nekrotisierende Meningitis	exsudative Form der FIP
s337/04, EKH, 10 Monate, frisch	Katzenschnupfen?, FIP?	multifokale granulomatöse Nephritis, stecknadelspitzgroße Granulome in den Meningen	multifokale z. T. hgr. perivaskuläre Infiltrationen mit Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und einzelnen Neutrophilen in Niere, Milz, Gehirn	trockene Form der FIP

Tabelle 10.1 (Fortsetzung): Anamnese sowie pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde der Katzen, die in der Antikörperversuchsreihe und in der semiquantitativen Bewertung des FCV3-70 verwendet wurden				
Tgbnr., Rasse, Alter, Geschlecht, Frischegrad	Anamnese	Pathologische Befunde	Pathologisch-histologische Befunde	Diagnose
s748/04, 4 Monate, m, frisch	seit 25 Tagen in Besitz, schlapp, Fieber, neurologische Ausfallserscheinungen	multiple Granulome in Nieren, Gehirn, Leber	Niere, Lunge, Leber: granulomatös-nekrotisierende Entzündung, Gehirn: hgr. granulomatöse Meningitis und Plexus Chorioiditis	trockene Form der FIP
s890/04, Heilige Birma, 6 Monate, m, relativ frisch	Ataxie, FIP-Verdacht	gefäßassoziierte granulomatöse Nephritis, mehrere Granulome in den Meningen	Niere, Gehirn: perivaskuläre gemischtzellige Infiltrate, Milz: mgr. akute Stauung	trockene Form der FIP
s1039/04, 1 Jahr, m, nicht mehr frisch	bernsteinfarbener Aszites, FIP-Verdacht	Bauchhöhle: hgr. fibrinöse und exsudative Peritonitis, Granulome in Niere, Netz, Milz, vergrößerte Mesenteriallkn., Lunge: Ödem, Stauung	Gehirn: pyogranulomatöse Leptomeningitis, Milz: pyogranulomatöse Serositis, Netz, Zwerchfell, Mesenteriallkn., Leber, Niere: multiple Granulome, Lunge: alveoläres Ödem, akute Stauung	exsudative Form der FIP
s138/05, 8 Monate, m, nicht mehr frisch	Apathie, Inappetenz, Krämpfe, Ikterus, Tod	Ikterus, Granulome auf Leber, Niere, Meningen, Fibrinauflagerungen auf der Lunge, hgr. akutes diffuses alveoläres Ödem in der Lunge	Leber, Lunge, Niere: multiple granulomatös-nekrotisierende Herde, Gehirn: multiple teils perivaskuläre Herde in der Meninx	trockene Form der FIP
s156/05, Heilige Birma, 8 Monate, m, faul	schlechter Allgemeinzustand	anämisch, perihepatische Fibrinschleier, 15 ml grüngelbliches Hydroperitoneum, Lunge, Niere, Leber: Granulom	Granulomatös-nekrotisierende Hepatitis, Lymphadenitis, Nephritis, Pleuritis, z. T. Vaskulitis	trockene Form der FIP

Tabelle 10.1 (Fortsetzung): Anamnese sowie pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde der Katzen, die in der Antikörperversuchsreihe und in der semiquantitativen Bewertung des FCV3-70 verwendet wurden				
Tgbnr., Rasse, Alter, Geschlecht, Frischegrad	Anamnese	Pathologische Befunde	Pathologisch-histologische Befunde	Diagnose
s345/05, 9 Monate, w, faul	FIP-Verdacht	Anämie, Aszites mit mehreren Granulomen im Netz und Nieren	Darm: herdförmige lymphozytäre Infiltrate in Submukosa, Niere: ausgedehnte Herde granulomatös-nekrotisierende Nephritis, Milz: nur atrophische Follikel, entseichert, Lunge: hgr. alveoläres Ödem	exsudative Form der FIP
s480/05, EKH, 1 Jahr, mk, faul	ZNS-Ausfallserscheinungen	multifokale Granulome in den Nieren, Gehirn, Milz: ausgeprägte follikuläre Hyperplasie	Niere: granulomatös-nekrotisierende Entzündung mit herdförmigen Fibrinablagerungen, Gehirn, Herz: granulomatös-nekrotisierende Perikarditis, Meningitis	trockene Form der FIP

Tgbnr.: Tagebuchnummer, Britisch Kurzhaar, EKH: Europäisch Kurzhaar, ggr: geringgradig, hgr.: hochgradig, Mesenterialkn: Mesenteriallymphknoten, mgr.: mittelgradig

n. a.: nicht angegeben; m: männlich; mk: männlich-kastriert; w: weiblich; wk: weiblich-kastriert; EKH: Europäisch Kurzhaar; rel. frisch: relativ frisch; n. m. frisch: nicht mehr frisch,

Tabelle 10.2: Ergebnisse der Bewertung des FCV3-70

Tagebuch- nummer	Frischegrad	Ak	RI	Hgf
s748/04	1	1	3	0
s748/04	1	2	3	0
s748/04	1	3	3	0
s748/04	1	4	2	0
s748/04	1	5	2	0
s748/04	1	6	3	1
s337/04	1	1	3	0
s337/04	1	2	3	1
s337/04	1	3	3	0
s337/04	1	4	2	1
s337/04	1	5	3	0
s337/04	1	6	3	1
s293/03	1	1	2	0
s293/03	1	2	2	0
s293/03	1	3	3	0
s293/03	1	4	1	0
s293/03	1	5	3	1
s293/03	1	6	3	1
s2378/02	1	1	2	0
s2378/02	1	2	3	0
s2378/02	1	3	3	0
s2378/02	1	4	2	1
s2378/02	1	5	2	0
s2378/02	1	6	3	1
s1597/03	1	1	1	0
s1597/03	1	2	0	0
s1597/03	1	3	1	0
s1597/03	1	4	1	0
s1597/03	1	5	1	0
s1597/03	1	6	2	1
s343/03	1	1	1	0
s343/03	1	2	3	0
s343/03	1	3	2	0
s343/03	1	4	1	1
s343/03	1	5	1	0
s343/03	1	6	2	1
s82/04	2	1	3	0
s82/04	2	2	3	0
s82/04	2	3	3	0
s82/04	2	4	2	1
s82/04	2	5	1	0
s82/04	2	6	3	1
s890/04	2	1	3	0
s890/04	2	2	3	0
s890/04	2	3	3	0
s890/04	2	4	2	0
s890/04	2	5	2	0
s890/04	2	6	3	1
s261/03	2	1	2	0

Tabelle 10.2 (Fortsetzung): Ergebnisse der Bewertung des FCV3-70

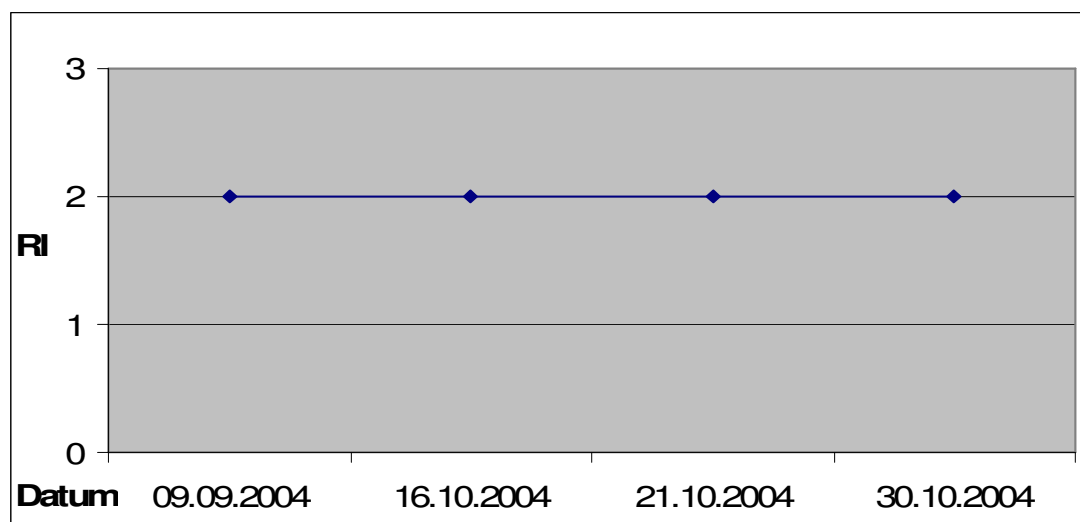
Tagebuch- nummer	Frischegrad	Ak	RI	Hgf
s261/03	2	2	2	0
s261/03	2	3	3	0
s261/03	2	4	2	0
s261/03	2	5	2	0
s261/03	2	6	3	1
s327/03a	2	1	2	0
s327/03a	2	2	3	0
s327/03a	2	3	2	0
s327/03a	2	4	2	0
s327/03a	2	5	2	0
s327/03a	2	6	3	1
s291/03	2	1	1	0
s291/03	2	2	1	0
s291/03	2	3	3	0
s291/03	2	4	2	1
s291/03	2	5	1	0
s291/03	2	6	3	1
s327/03	2	1	1	0
s327/03	2	2	1	0
s327/03	2	3	1	0
s327/03	2	4	1	0
s327/03	2	5	1	0
s327/03	2	6	3	1
s1139/02	3	1	3	0
s1139/02	3	2	3	0
s1139/02	3	3	3	0
s1139/02	3	4	3	1
s1139/02	3	5	3	0
s1139/02	3	6	3	0
s1624/03	3	1	3	0
s1624/03	3	2	3	0
s1624/03	3	3	3	0
s1624/03	3	4	3	1
s1624/03	3	5	1	0
s1624/03	3	6	3	1
s2102/02	3	1	2	1
s2102/02	3	2	2	0
s2102/02	3	3	2	0
s2102/02	3	4	2	1
s2102/02	3	5	2	0
s2102/02	3	6	3	1
s1039/04a	3	1	2	0
s1039/04a	3	2	2	0
s1039/04a	3	3	2	0
s1039/04a	3	4	2	0
s1039/04a	3	5	2	0
s1039/04a	3	6	3	1
s138/05	3	1	1	0
s138/05	3	2	3	0

Tabelle 10.2 (Fortsetzung): Ergebnisse der Bewertung des FCV3-70

Tagebuch-nummer	Frischegrad	Ak	RI	Hgf
s138/05	3	3	1	0
s138/05	3	4	1	1
s138/05	3	5	1	0
s138/05	3	6	3	0
s1039/04	3	1	1	0
s1039/04	3	2	1	0
s1039/04	3	3	1	0
s1039/04	3	4	1	0
s1039/04	3	5	0	0
s1039/04	3	6	1	1
s480/05	4	1	3	0
s480/05	4	2	3	0
s480/05	4	3	3	0
s480/05	4	4	2	0
s480/05	4	5	1	1
s480/05	4	6	3	1
s345/05a	4	1	3	0
s345/05a	4	2	3	0
s345/05a	4	3	2	0
s345/05a	4	4	1	0
s345/05a	4	5	0	0
s345/05a	4	6	3	0
s634/03	4	1	2	0
s634/03	4	2	3	0
s634/03	4	3	2	0
s634/03	4	4	2	1
s634/03	4	5	1	0
s634/03	4	6	3	0
s129/03	4	1	2	0
s129/03	4	2	3	0
s129/03	4	3	3	0
s129/03	4	4	2	1
s129/03	4	5	2	0
s129/03	4	6	3	1
s156/05	4	1	1	0
s156/05	4	2	3	0
s156/05	4	3	1	0
s156/05	4	4	1	0
s156/05	4	5	1	0
s156/05	4	6	3	0
s345/05	4	1	1	0
s345/05	4	2	1	0
s345/05	4	3	1	0
s345/05	4	4	1	1
s345/05	4	5	0	0
s345/05	4	6	3	0

Frischegrad: 1= frisch; 2= relativ frisch; 3= nicht mehr frisch; 4= faul; **Antikörper (Ak):** 1= FCV3-70; 2= 52D5; 3= F19-1; 4= 6F7; 5= 1F12; 6= „Cocktail“; „...a“ = anderes Granulom vom selben Schnitt, Hgf: Hintergrundfärbung, Einteilung der Hgf siehe Tabelle 3.7, Einteilung der RI siehe Tabelle 3.6

Grafik 10.1: Variabilität der RI der Positivkontrolle in den verschiedenen Inkubationsläufen



RI: Reaktionsintensität

Tabelle 10.3: Anamnese sowie pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde der fraglichen FIP-Katzen,				
Tgbnr., Rasse, Alter, Geschlecht	Anamnese	Pathologisch-anatomische Befunde	Pathologisch-histologische Befunde	Diagnose
s1349/02 Maine Coon, 2 Jahre, mk	Inappetenz, Gewichtsverlust, Nasenausfluss, Harninkontinenz	<ul style="list-style-type: none"> - Bauchhöhle: mittelgradige diffuse granulomatöse Peritonitis - Brusthöhle: mittelgradige diffuse granulomatöse Pleuritis - Lunge: drei stecknadelkopfgroße über die Oberfläche ragende weiß-farblose scharf begrenzte Herde - Sternal- und Mandibular-Lymphknoten vergrößert 	<ul style="list-style-type: none"> - Gehirn / Leptomeninx: fokale perivaskuläre gemischtzellige Infiltration - Brusthöhle: gemischtzellige Infiltration der Pleura - Lunge: mittelgradiges Ödem; fokale granulomatöse pleurale Entzündung - Netz, Darmserosa: multifokale hochgradige granulomatöse Serositis - Nieren: geringgradige multifokale interstitielle gemischtzellige Infiltration und mittelgradiger Fibrosierung - Pankreas, Thymus, Nebennieren: ohne besonderen Befund (o.b.B.) - Knochenmark: zellreich 	trockene Form der FIP
s1565/02 Britisch Kurzhaar, 15 Monate, w	seit zwei Wochen krank, Abmagerung, gelbe Schleimhäute, FIP-Verdacht	<ul style="list-style-type: none"> - mittelgradige Anämie - Mesenterial-Lymphknoten: deutlich vergrößert, Schnittfläche: weißlich, speckig - Leber: feinhöckrig, gelblich-braun 	<ul style="list-style-type: none"> - Mesenterial-Lymphknoten: nekrotisierend-granulomatöse Entzündung - Milz: follikuläre Hyperplasie - Knochenmark: zellreich - Leber: straßenartig konfluierende Nekrosen in Zone 2 und 3 - Lunge: hochgradige Stauung und Ödem - Gehirn, Niere: o.b.B. 	trockene Form der FIP
s2395/02 Perser, 4,5 Monate, m	Kardiomegalie, Verdacht auf Rechtslage des Herzens, hochgradige Dyspnoe	<ul style="list-style-type: none"> - Thorax: linke Brusthälfte ca. 120 ml trüber rötlicher Erguss mit Eiter- und Fibrinflocken, rechte Brusthälfte: geringgradige 	<ul style="list-style-type: none"> - Lunge: diffuse granulomatös-nekrotisierende Pleuritis mit hochgradigen Fibrinablagerungen sowie ausgeprägter Kompressionsatelektase 	exsudative Form der FIP

Tabelle 10.3 (Fortsetzung): Anamnese sowie pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde der fraglichen FIP-Katzen				
Tgbnr., Rasse, Alter, Geschlecht	Anamnese	Pathologisch-anatomische Befunde	Pathologisch-histologische Befunde	Diagnose
		granulomatöse Pleuritis - Lunge: linke Hälfte hochgradig atrophiert/verdichtet rechts zwei keilförmige, etwa zwei cm lange weiße Bereiche, leicht granuliert, - Herz: geringgradige weißliche granuliert Auflagerungen; physiologische Lage	des Parenchyms - Milz: leichte follikuläre Hyperplasie - Knochenmark: sehr zellreich - Nieren, Trachea: o.b.B.	
s672/03 Siam, 4 Monate, m	Abmagerung, Fieber, Erguss in Bauchhöhle und Skrotum, 6 mg/dl Protein im Erguss	- allgemeiner Ikterus - Brusthöhle: ca. 10 ml seröser Thoraxerguss - Netz: kleine Granulome - Fibrinöse Perihepatitis und –splenitis - Hoden: o.b.B.	- Großes Netz, Peritoneum der Bauchwand, Leberkapsel: granulomatös-nekrotisierende Entzündung mit Infiltration vor allem von Plasmazellen sowie fortgeschrittene Autolyse - Milz: große Follikel mit Lymphozytendepletion sowie Autolyse - Lunge: akute Stauung und Ödem sowie fortgeschrittene Autolyse - Knochenmark: sehr zellreich - Darm, Nieren, Gehirn: bis auf fortgeschrittene Autolyse o.b.B.	exsudative Form der FIP
s1073/03 EKH, 6 Jahre, mk	seit einer Woche Fieber, schlechtes Allgemeinbefinden, Gingivitis, Thoraxpunktat: gelbe fadenziehende Flüssigkeit, FIP-Verdacht	- Brusthöhle: circa 30 ml geleeartiger Erguss - Lunge: alveoläres Ödem - Nieren: bis zu erbsengroße Granulome - Leber: stecknadelkopfgröße weiße Herde im Parenchym	- Nieren: granulomatöse (z. T. eitrig-nekrotisierende) Nephritis - Milz: akute Stauung - Auge: granulomatös-nekrotisierende Uveitis, Hyphäma - Leber: multiple Granulome, akute Stauung, Meslinn: o.b.B. - Lunge: granulomatöse Pleuritis - Knochenmark, Darm	exsudative Form der FIP

Tabelle 10.3 (Fortsetzung): Anamnese sowie pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde der fraglichen FIP-Katzen				
Tgbnr., Rasse, Alter, Geschlecht	Anamnese	Pathologische Befunde	Pathologisch-histologische Befunde	Diagnose
s2060/03 2 Jahre, m	vor 6 Wochen Schnupfen, jetzt ZNS-Ausfallserscheinungen Muskelatrophie	<ul style="list-style-type: none"> - Tierkörper: geringgradige Adipositas - Niere: in einer Lokalisation an Rinden-Markgrenze herdförmige Aufhellung des Parenchyms - Milz: geringgradig geschwollen - Darm: geringgradige Kotanschoppung in Kolon und Rektum 	<ul style="list-style-type: none"> - Gehirn: ausgeprägte granulomatös-nekrotisierende Meningoenzephalitis mit vor allem perivaskulärer und meningealer Lokalisation - Niere: herdförmige nichteitrige interstitielle Nephritis - Lunge: akute Stauung und Ödem - Leber, Milz, Darm, Knochenmark: bis auf beginnende Autolyse o.b.B. 	trockene Form der FIP
s89/04 4 Monate, m	rezidivierendes Fieber, OP: vergrößerte Mediastinal-Lymphknoten, Verdacht auf Leukose	<ul style="list-style-type: none"> - Tierkörper: mittelgradig anämisch - Mediastinal-Lymphknoten: insgesamt walnussgroß, weiß-beige, weiche Konsistenz - Leber: multiple weiß-beige stecknadelkopf- bis erbsengroße Herde im Parenchym - Darm: Koprostase 	<ul style="list-style-type: none"> - Leber, Mesenterial-Lymphknoten: granulomatös-nekrotisierende Entzündung mit zahlreichen Lymphoblasten - Milz: Follikuläre Hyperplasie mit zahlreichen Lymphoblasten - Knochenmark: sehr zellreich - Darm: Aktivierung der Peyer-Plaques mit zahlreichen Blasten - Niere, Lunge: Mäßige akute Stauung - Gehirn: lockere Infiltration der Meningen mit mononukleären Zellen 	trockene Form der FIP

Tabelle 10.3 (Fortsetzung): Anamnese sowie pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde der fraglichen FIP-Katzen				
Tgbnr., Rasse, Alter, Geschlecht	Anamnese	Pathologisch-anatomische Befunde	Pathologisch-histologische Befunde	Diagnose
s431/04 EKH, 1 Jahr, w	Verdacht auf Katzenschnupfen	<ul style="list-style-type: none"> - Nieren: multifokal das Parenchym durchsetzende weiße stecknadelkopfgroße teils konfluierende Herde - Leber: dito - Nasenschleimhaut: stark gerötet, schleimiges Exsudat - Darm: hochgradiger Endoparasitenbefall (Askariden) - Lunge: stecknadelkopfgroße weiße Herde - Milz: follikuläre Hyperplasie 	<ul style="list-style-type: none"> - Niere: multifokale granulomatös-nekrotisierende Nephritis - Leber: multifokale Granulome im Parenchym - Lunge: multiple z. T. subpleurale Granulome - Lymphknoten: Sinushyperämie und –histiozytose - Thymus: Involution - Knochenmark: sehr zellreich - Milz: follikuläre Hyperplasie und Depletion 	trockene Form der FIP
s542/04 Heilige Birma, 1 Jahr, m	Verdacht auf infektiöse Erkrankung des ZNS, kühle Hintergliedmaße	<ul style="list-style-type: none"> - Magen: Reste eines roten Luftballons im Pylorusbereich - Lunge: hochgradiges alveoläres Ödem, mittelgradige Stauung - Leber, Nieren: o.b.B. - Milz: gestaut 	<ul style="list-style-type: none"> - Gehirn: mononukleäre Perivaskulitis und Meningitis mit zahlreichen Plasmazellen und Makrophagen - Knochenmark: sehr zellreich - Lunge: hochgradiges alveoläres Ödem, mittelgradige Stauung - Milz: akute Stauung - Darm, Niere, Leber: o. b. B. 	trockene Form der FIP

o.b.B.: ohne besonderen Befund; Tgnr.: Tagebuchnummer, m: männlich, mk: männlich-kastriert, w: weiblich, wk: weiblich-kastriert

Tabelle 10.4: Anamnese sowie pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde der Kontrollkatzen (Negativkontrollen)				
Tgbnr., Alter, Geschlecht	Anamnese	Pathologische anatomische Befunde	Pathologisch-histologische Befunde	Diagnose
s1800/02 3 Monate, m	Katzenschnupfen, plötzlich verstorben	<ul style="list-style-type: none"> - Magen-Darm-Trakt: akute diffuse katarrhalische Enteritis - Lunge: katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie der Spitzenlappen, in der Trachea Mageninhalt und Schleim - Leber, Milz, Niere: akute Stauung; Herz: ohne besonderen Befund (o.b.B.) 	<ul style="list-style-type: none"> - Lunge: hochgradige katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie, herdförmige nekrotisierende Pneumonie - Milz: zellreiche rote Pulpa, Follikel depletiert - Knochenmark: hochgradig aktiviert - Nase: chronische eitrige Rhinitis - Gehirn: akute Stauung 	Katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie
s2368/02 10 Wochen, m	plötzliche Exsikkose, Abmagerung, Apathie, Durchfall	<ul style="list-style-type: none"> - Darm: akute diffuse katarrhalische Enteritis mit 2 Bandwürmern - Knochenmark: zerfließlich 	<ul style="list-style-type: none"> - Dünndarm: abschnittsweise mäßiger Schwund von Kryptenepithel mit Zottenverkürzung - Knochenmark: o. b. B. - Lunge: akute Stauung und Ödem, sowie herdförmiges alveoläres Emphysem <p>Immunhistologischer Nachweis auf Parvovirose verlief mit positivem Ergebnis.</p>	Parvovirose; Nebenbefund: endogene Parasitose (Dipylidium caninum)

Tabelle 10.4 (Fortsetzung): Anamnese sowie pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde der Kontrollkatten (Negativkontrollen)				
Tgbnr., Alter, Geschlecht	Anamnese	Pathologisch-anatomische Befunde	Pathologisch-histologische Befunde	Diagnose
s87/03 juvenil, w	bei / nach Kastrations-OP verstorben	<ul style="list-style-type: none"> - Lunge: akutes alveoläres Lungenemphysem - Laparotomiestelle: Haut / Muskulatur: ohne entzündliche Reaktionen - Uterus: Ligaturen an beiden Uterushörnern - Linke Uterusspitze: distal der Ligatur erbsengroß aufgetrieben und blutig - Rechte Uterusspitze: reaktionslos 	<ul style="list-style-type: none"> - (OP-) Uterusstümpfe: eitrig-nekrotisierende demarkierende Entzündung - Gehirn: gemischtzellige, überwiegend eitrig Meningoenzephalitis - Herz, Milz, Lunge, Pankreas, Leber, Knochenmark, Darm, Niere, Thymus: o. b. B. - Lymphknoten: aktivierte Follikel 	Herz-Kreislaufversagen unklarer Ursache
s344/03 Norwegische Waldkatze, 2 Monate, m	abwechselnd Diarrhoe und Obstipation, beginnende Exsikkose	<ul style="list-style-type: none"> - Darm: akute diffuse katarrhalische Enteritis - Lunge, Leber, Milz: hochgradig akut gestaut 	<ul style="list-style-type: none"> - Darm, Lunge, Leber, Milz: keine über die makroskopischen Veränderungen hinausgehende Veränderungen - Immunhistologischer Nachweis auf Parvovirose verlief mit positivem Ergebnis. 	Parvovirose
s371/03 8 Jahre, m	Akute Atemnot, in Seitenlage, Bestandsprobleme mit respiratorischen Symptomen, Pasteurellen nachgewiesen	<ul style="list-style-type: none"> - Thorax: hochgradiger Hydro-, Haemothorax mit hochgradigen Tötungsmittelarterfakten - Lunge, Herz: o. b. B. - Niere: beidseitige ältere Infarktarnben, multiple grau-weiße Knötchen - Leber, Milz: akute Stauung 	<ul style="list-style-type: none"> - Niere: multifokale chronische interstitielle Nephritis, interstitielle Fibrose, Sklerosierte Glomerulaschlingen (alte Infarktarnben) - Milz: follikuläre Depletion - Lunge: alveoläre Stauung und Ödem - Darm, Lymphknoten, Gehirn: o. b. B. 	Alte Infarktarnben der Nieren

Tabelle 10.4 (Fortsetzung): Anamnese sowie pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde der Kontrollkatten (Negativkontrollen)				
Tgbnr., Alter, Geschlecht	Anamnese	Pathologisch-anatomische Befunde	Pathologisch-histologische Befunde	Diagnose
s1756/03 juvenil, m	keine Angaben	<ul style="list-style-type: none"> - Magen: herdförmige erosive Gastritis - obere Atemwege: eitrig-mukoider Nasenausfluss, kaudal des weichen Gaumens ca. kirschgroße gestielte Zubildung mit strangartiger Verbindung (Tuba auditiva zum Mittelohr), Bulla tympanica und Mittelohr mit Eiter gefüllt, äußerer Gehörgang o. b. B. - Lunge: hochgradiges alveoläres Ödem, akute Stauung - Milz, Leber: geringgradige Stauung - Niere, Gehirn, Darm: o. b. B. 	<ul style="list-style-type: none"> - Niere: multifokale intratubuläre Verkalkungen - Nase: Schleimhautpolyp mit Epithelhyperplasie und chronischer eitrig Entzündung - Thymus: Involution - Knochenmark: hochgradig aktiviert 	Polyp in oberen Atemwegen
s1762/03 juvenil, w	Untertemperatur, Kachexie, hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden	<ul style="list-style-type: none"> - Darm: diffuse katarhalische Enteritis - Lunge: mittelgradiges alveoläres Lungenödem 	keine über die makroskopischen Veränderungen hinausgehenden Befunde	Diffuse katarhalische Enteritis
s1765/03 2 Monate, m	Apathie, Inappetenz, Erbrechen, Parvoviroseverdacht	<ul style="list-style-type: none"> - Lunge: verdichtete dunkelrote Bereiche - Milz: follikuläre Hyperplasie 	<ul style="list-style-type: none"> - geringgradige katarhalisch-eitrige Bronchopneumonie - Milz: geringgradige follikuläre Hyperplasie - Gehirn, Netz, Darm, Nieren: o. b. B. 	Geringgradige katarhalisch-eitrige Bronchopneumonie

Tabelle 10.4 (Fortsetzung): Anamnese sowie pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde der Kontrollkatten (Negativkontrollen)				
Tgbnr., Alter, Geschlecht	Anamnese	Pathologische anatomische Befunde	Pathologisch-histologische Befunde	Diagnose
s376/04 EKH, 2 Jahre, m	Lungenproblematik, seit mehreren Monaten Kortisongabe ohne Erfolg	<ul style="list-style-type: none"> - Nase: katarrhalische Rhinitis - Lunge: ein erbsengroßer Knoten im linken Hauptlappen - Niere, Milz: mittelgradige akute Stauung 	<ul style="list-style-type: none"> - Nase: herdförmig plasmazelluläre Mukosainfiltrate - Lunge, Bronchien: hochgradige Ekstasie, angüllt mit Zeldetritus und neutrophilen Granulozyten - Herz: mittelgradige interstitielle Fibrose - Leber: geringgradige diffuse kleinvakuläre hepatozelluläre Verfettung - Niere, Milz.: mittelgradige akute Stauung - Gehirn: o. b. B. 	katarrhalisch-eitrige Bronchitis aufgrund einer Mischinfektion mit Klebsiella pneumoniae und Mykoplasma pulmonis
s663/03 Abessinier, 6 Wochen, m	Diarrhoe, Vomitus, plötzlich gestorben	<ul style="list-style-type: none"> - Magen: Übergang Duodenum: Ulkus, im Magen Blutkoagel - Darm: diffuse katarrhalische Enteritis 	<ul style="list-style-type: none"> - Darm: abschnittsweise Schwund des Kryptenepithels - Lunge: Mäßige akute Stauung und Ödem - Leber, Milz, Niere, Gehirn: o. b. B. 	Blutendes Magenulkus

o.b.B.: ohne besonderen Befund, Tgnr.: Tagebuchnummer, männlich: m, männlich-kastriert: mk, weiblich: w, weiblich-kastriert: wk

10.2 Lösungen und Puffer

Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Lösung (DAB)

- 1) 100 mg DAB in 200 ml 0,1 M Imidazol/HCl
Puffer (pH-Wert 7,1) lösen und mischen (Magnetrührer).
- 2) Filtrieren und unmittelbar vor Gebrauch 70 µl 30 %igem H₂O₂ zugeben

Imidazol/HCl-Puffer 0,1 M (pH-Wert 7,08)

6,81 g Imidazol ad 1000 ml Aqua dest.

Zugabe von etwa 500 ml 0,1 M HCl und Einstellen des pH-Wertes auf 7,08 am pH-Meter (Modell CG820, Schott Geräte GmbH) mit 0,1 M HCl.

Lösung ca. 1 Woche haltbar, Verwendung nur bei pH-Wert < 7,2

Kardasewitsch-Lösung

40 ml Ammoniaklösung 25 %

160 ml Ethanol 70 %

Lösung kann verwendet werden, so lange der typische Ammoniakgeruch wahrnehmbar ist.

Papanicolauos Gebrauchslösung

Papanicolauos Hämatoxylin 1b und Aqua dest. im Verhältnis 1:10 mischen und filtrieren.

Phosphat-buffered saline (PBS, pH-Wert 7,2)

Stammlösung:

42 g NaCl

9,26 g Na₂HPO₄ x H₂O

2,15 g KH₂PO₄

Aqua bidest. ad 1000 ml

Gebrauchslösung:

Stammlösung 1:5 in Aqua bidest. verdünnen

Einstellen des pH-Wertes mit 0,1 N Salzsäure oder 1 N Natronlauge

Tris-buffered saline (TBS, pH-Wert 7,65)*Stammlösung (10x):*

60,75 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

610 ml Aqua dest.

390 ml 1 N HCl

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung

900 ml NaCl 0,8 % in Aqua dest.

Einstellen des pH-Wertes auf pH 7,65 mit 1 N NaOH bzw. HCl

Lösung zur Trypsin-Behandlung (0,25 % Trypsin, 0,02 % CaCl₂; pH-Wert 7,6)

0,25 g Trypsin

0,02 % CaCl₂ x H₂O

Lösen in etwa 90 ml Aqua dest. (auf 37 °C vorgewärmt), Einstellen des pH-Wertes mit 0,2 M NaOH (ca. 2 ml); ad 100 ml Aqua dest.

Zitratpuffer (10 mM; pH-Wert 4,0 beziehungsweise 6,0)*Stammlösung A:* 0,1 M Zitronensäure

19,03 g Zitronensäure

1000 ml Aqua dest.

Stammlösung B: 0,1 M Natriumzitrat

27,36 g Trinatriumzitrat

1000 ml Aqua dest.

Lagerung der Stammlösung bei 2 – 8 °C

Gebrauchslösung:

9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B mit 450 ml Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und mischen. Gegebenenfalls den pH-Wert mit 0,1 M HCl auf pH-Wert 6,0 bzw. 4,0 einstellen.

.

10.3 Bezugsquellen

B. Braun Melsungen AG

Wasserbad Thermomix 1480/Frigomix 1496

Custom Monoclonals International, West Sacramento, CA, USA

Maus anti-felines Coronavirus (Klon FCV3-70)

Dako Diagnostika, Hamburg

DAKO® Target Retrieval solution, 10x concentrate, s1699

Maus anti-myeloid/histiocyte Antigen, MO747

Dianova GmbH, Hamburg

Maus-PAP, 223005025

Ratte anti-Maus IgG, H&L, 415005100

TUF® (Target Unmasking Fluid) Kreatec, SP-0025

Engelbrecht Medizin- und Labortechnik-GmbH, Edermünde

StarFrost Objektträger, 11300

SuperFrost Plus Objektträger, 11246

Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm

3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) purum p.a., 32750

Imidazol, puriss. p. a., 56750

NaCl, 71381

Natriumzitat, purum p. a., 71406

Tris(hydroxymethylaminomethan), 93352

Trypsin from hog pancreas, 93613

Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel

Mikrowellenstandküvetten

IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, Maine, USA

monoklonale Antikörper, von Susan Fiscus hergestellt:

52D5	gegen das N-Protein des FCoV gerichtet
6F7	gegen das M-Protein des FCoV gerichtet
1F12	gegen das S-Protein des FCoV gerichtet

Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen

Histosafe Enhancer, E7000

Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

Eosin, 0,1 % wässrig, 109844

Imidazol, 4716

Kaliumchlorid, 104935

Kalziumchlorid, 2382

Mayers Hämalalaun, 109249

Methanol, 106008

Natriumchlorid krist., 106400

Natriumphosphat, 1.06580.1000

Natrtriumhydroxid, 106498

Papanicolaous-Lösung 1b, 9254

Perhydrol® 30 %, H₂O₂ p. a., 107210

2-Propanol (Isopropylalkohol) reinst, 995

Salzsäure (Titrisol®), 1 N, 109970

Salzsäure-Alkohol, 100327

Toluidinblau-Lösung, 115930

Zitronensäure, 6490.1

Roth C. GmbH & Co KG Chemische Fabrik, Karlsruhe

Ammoniaklösung reinst, 5460.1

Formalin, 4980

Isopropylalkohol, 9866

Methanol, 7342

Xylol, 7913

Xylol-Ersatz (Roti®-Histol), 6640.1

Zitronensäure, kristallin, 6490.1

SAV-Liquid Productions, Feldkirchen

Ethanol 96 % vergällt mit MEK

Schott Geräte GmbH

pH-Meter Modell CG820

Sigma, Deisenhofen

bakterielle Protease Typ XXIV, P – 8038

Shandon, Frankfurt/Main

Coverplates™, 7211013

Coverplate-Kassetten™, 7331017

Vector Laboratories, Burlingham, Kalifornien, USA

Pferd anti-Maus IgG, biotyliniert, BA-20000

Vogel Wilhelm GmbH & Co KG, Gießen

Paraffin, rein, 137212

Einbettautomat TissueTec® VIP Miles Scientific

Eindeckautomat TissueTec®, Mod. 4765

Zymed Laboratories, Kalifornien, USA

HRP-Streptavidin Conjugate [43-4323]

10.4 Abkürzungen

ABC-Methode	Avidin-Biotin-Methode
ADE	Antibody depending enhancement
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APN	Aminopeptidase N
AR	Antigen Retrieval (Antigen-Demaskierung)
BCV	bovines Coronavirus
bideest.	bideestillata
C3	Komponente 3 des Komplementsystems
CD4-Zellen	CD4 Antigen exprimierende T-Lymphozyten
CCV	canines Coronavirus
CoV	Coronavirus
DAB	Diaminobenzidin(-tetrahydrochlorid)
dest.	destillata
DTRS	DAKO® Target Retrieval Solution
EKH	Europäische Kurzhaarkatze
E-Protein	Envelopeglykoprotein
Fab-Fragment	Fragment-Antigen-Binding
Fc-Fragment	Fragment crystalline (kristallines Fragment)
FCoV	Felines Coronavirus
FECV	Felines Enteriales Coronavirus
FeLV	Felines Leukämievirus
FIP	Feline Infektiöse Peritonitis
FIPV	Felines Infektiöses Peritonitisvirus
HCl	Salzsäure
HCV-229E/HCoV-229E	humanes respiratorisches Coronavirus 229E
HCV-OC43/HCoV-OC43	humanes respiratorisches Coronavirus OC43
HE	Haemagglutinin-Esterase-Glykoprotein
HEV	porcines haemagglutinierendes Enzephalomyelitis-Virus
H&E	Hämatoxylin-Eosin
Hgf	Hintergrundfärbung
HRP	Horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

IBV	aviäres infektiöses Bronchitis-Virus
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IH	Immunhistologie
IL	Interleukin
IP	Isoelektrischer Punkt
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
KM	Knochenmark
Le	Leber
LHE	Linaris® Histosafe Enhancer
Lnn	Lymphknoten
LSAB-Methode	Labeled Streptavidin-Biotin-Methode
Lu	Lunge
mAk	monoklonaler Antikörper
M	Molar
m	männlich
MHV	Murines Hepatitis Virus
mk	männlich-kastriert
MMP9	Metalloproteinase 9
mM	miliMolar
M-Protein	Membranglykoprotein
mRNS	messengerRNS
N	Normal
Ni	Niere
nm	Nanometer
N-Protein	Nukleokapsidphosphoprotein
o.b.B.	ohne besonderen Befund
Obj.	Objektiv
ORF	Open Reading Frame
PAP-Methode	Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode
PBS-Puffer	Phosphate-buffered saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)

PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
Pol	Polymerase
PRCoV	porzines respiratorisches Coronavirus
RER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
RbCoV	Kaninchen Coronavirus
RI	Reaktionsintensität
RM	Rückenmark
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
r_s	Korrelationskoeffizient nach Spearman
SARS-CoV	severe acute respiratory syndrome-Coronavirus
SDAV	Sialodakryadenitis-Virus
S-Protein	Spikeglykoprotein
Tgbnr.	Tagebuchnummer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TBS	Tris-buffered saline (Tris gepufferte Kochsalzlösung)
TCV	Truthahn- Coronavirus
TGEV	porzines transmissibles Gastroenteritis-Virus
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRS	Transcription regulating sequences
TUF [®]	Target unmasking fluid
w	weiblich
wk	weiblich-kastriert
ZP	Zitratpuffer

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Danksagung

Herrn Prof. Reinacher danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. „Machen Se` mal“

Herrn Dr. Failing und Frau Sparenberg vom Institut für Biomathematik der Justus-Liebig-Universität Giessen danke ich für ihre unerschöpfliche Geduld bei der statistischen Beurteilung meiner Daten.

Susan Fiscus danke ich für die Herstellung der von mir verwendeten monoklonalen Antikörper. IDEXX und Prof. Hohdatsu danke ich für die unentgeltliche Überlassung der monoklonalen Antikörper.

Herrn Dr. Hecht danke ich für die wertvollen und hilfreichen Diskussionen.

Dr. Udo Hetzel und Dr. Kernt Köhler danke ich für die Einführung in die Geheimnisse von Adobe Photoshop und die erste Anleitung in der Sektionshalle.

Frau Artelt danke ich für die Einführung in die Immunhistologie.

Sabine Wack danke ich für die Unterstützung bei der histologischen Schnitteherstellung und manchen netten Plausch.

Weiterhin möchte ich mich auch bei den Sektionsgehilfen, v.a. bei Jürgen Damm, für die tatkräftige Hilfe in der Sektionshalle bedanken.

Meinem Arbeitszimmer, v. a. Vladimir Kocoski und Corinna Hohloch danke ich für die nette und aufgelockerte Arbeitsatmosphäre.

Manfred Henrich danke ich für die freundliche Hilfe bei allen technischen Fragen.

Eva Kappe, die in dieser Zeit meine regelmäßige Squashpartnerin wurde.

Meinen Eltern danke ich für das Vertrauen in mich, die Doktorarbeit zu Ende zu bringen und die finanzielle Unterstützung trotz meiner halben Stelle.

Der Familie Reck danke ich für die nette Aufnahme an manchen Wochenenden und die konstruktive Unterstützung in Form von guten Diskussionen und langen Spaziergängen.

Mein herzlichster Dank gilt Ulla Reck, für die zu jeder möglichen und unmöglichen Zeit gewährte Unterstützung und die seelische Aufpäppelung, wenn es nicht so lief, wie es sollte. Du bist eine wahre Freundin.

Für die Durchsicht von Teilen meines Manuskriptes bedanke ich mich sehr bei Ute und Ulla Reck, Kernt Köhler und Anja Kipar.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen nicht namentlich genannten Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie für die gute und freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

werd scho` wern, is all weil was worn



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5356-7



9 1783835 195356 7 0